

VAIHTELEVAN KASVATUSYMPÄRISTÖN
JA EMOTAUSTAN VAIKUTUS
TARTTUVIIN LOIS- JA BAKTEERITAUTEIHIN
SEKÄ NIIDEN AIHEUTTAMAAN
KUOLLEISUUTEEN ITÄMEREN LOHEN
(*SALMO SALAR*) ISTUKASKASVATUKSESSA

Mariella Aalto-Araneda

Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma
Patologia ja parasitologia
Eläinlääketieteellisten bioteteiden osasto
Eläinlääketieteellinen tiedekunta
Helsingin yliopisto
2014



Tiedekunta - Fakultet - Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning – Department Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto	
Tekijä - Författare - Author Mariella Aalto-Araneda			
Työn nimi - Arbetets titel – Title Vaihtelevan kasvatusympäristön ja emotaustan vaikutus tarttuviin lois- ja bakteeritauteihin sekä niiden aiheuttamaan kuolleisuuteen itämeren lohen (<i>Salmo salar</i>) istukaskasvatuksessa			
Oppiaine - Läroämne - Subject Patologia ja parasitologia			
Työn laji - Arbetets art - Level Lisensiaatin tutkielma		Aika - Datum - Month and year Toukokuu 2014	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 69
Tiivistelmä - Referat – Abstract <p>Luonnonlohikantojen säilyminen ja kalastus ovat riippuvaisia vesiviljelyssä kasvatettujen kalanpoikasten istuttamisesta luonnonvesistöihin. Nykymenetelmillä istutustulokset ovat kuitenkin olleet heikkoja: viljeltyjen kalanpoikasten kuolleisuus luonnossa on suurempaa kuin villipoikasten. Kalat eivät opi vesiviljelyn staattisessa ympäristössä luonnossa tarvittavia selviytymiskeinoja. Myös geneettinen monimuotoisuus ja populaation valmius sopeutua luonnonoloihin heikkenee laitoksissa.</p> <p>Istukaskalojen laatua on pyritty parantamaan kehittämällä luontoa mukailevia, virikkeellisiä laitospasvatusympäristöjä. Vaihtelevan kasvatusympäristön ja luonnonemotaustan on esitetty myös edistävän lohikalojen kasvatusaikaista terveyttä. Kasvatusolosuhteet ja niiden aiheuttama valintapaine muokkaavat kalan ja taudinaiheuttajan ominaisuuksia, mm. vastustuskykyä ja virulenssia, jotka määrittävät, millainen isäntä-patogeeni -vuorovaikutuksesta muodostuu.</p> <p>Loiset ja muut taudinaiheuttajat lisäävät tuotantokustannuksia ja -tappioita vesiviljelyssä, joten tehokkaita tautitorjuntamenetelmiä kehitetään jatkuvasti. Merkittäviä patogeeneja istukaskasvatuksessa ovat mm. <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> -loinen (Ich) ja <i>Flavobacterium columnare</i> -bakteeri.</p> <p>Tutkielmassa tarkasteltiin, kuinka kasvatusympäristö ja kalakantojen laitostuminen vaikuttavat tarttuvien tautien esiintymiseen ja kasvatusaikaiseen kuolleisuuteen lohen istukaskasvatuksessa. Kokeellisessa osassa selvitettiin kuolleisuuden, loispvalenssien ja loisinnan intensiteetin eroja tavanomaisen ja virikkeellisen kasvatusmenetelmän sekä villi- ja laitosemotaustaisten kalojen välillä. Hypoteesina oli, että loisinfestaatio ja kokonaiskuolleisuus ovat vähäisempiä luonnon- kuin laitosemujen poikasilla, ja vastaavasti virikkeellisessä kuin tavanomaisessa kasvatusmenetelmässä.</p> <p>Tutkimus toteutettiin kalantutkimusasemalla Paltamossa kesällä 2010. Kussakin 16 tutkimusaltaassa oli kokeen alussa 2500 Torniojoen merilohenpoikasta. Altaat jaettiin emo- ja kasvatustaustan osalta neljään käsittelyyn: "laitos-standardi" (LS), "villi-standardi" (VS), "laitos-virike" (LV) ja "villi-virike" (VV). Virikealtaat luotiin suojapaikoin ja veden virtausta muuntelemalla.</p> <p>Ulkoloisten laji ja määrä tutkittiin iholimanäytteistä mikroskooppilla. Loisinfaation ja kasvatusmenetelmän sekä emotaustan yhteydet määritettiin Fisherin eksaktilla testillä. Allaskohtaista kuolleisuutta seurattiin kalantutkimuslaitoksen kirjanpidon avulla. Kuolleisuuskuvaajat laskettiin taulukkolaskentaohjelmassa. Loispvalenssien ja kuolleisuusprosenttien tilastollinen merkitsevyys määritettiin binomiaaliseen jakautumiseen perustuvan 95 % luottamusvälin avulla.</p> <p>Tutkimuksessa todettiin vahvoja trendejä kuolleisuuden, Ich-infestaation, emotaustan ja kasvatuksen yhteyksistä: Ich-loista esiintyi enemmän laitos- kuin villipoikasissa ja standardi- kuin virikealtaissa. <i>Trichodina</i>-loisen ja <i>Flavobacterium columnare</i> -bakteerin osalta trendit olivat päinvastaisia. Flavobakteeritartunta vaikutti altaiden loistautidynamiikkaan.</p> <p>Tulokset eivät ole yksiselitteisiä. Altain väliet erot, muut tarttuvat taudit ja kalayksilön loisinfestaation riippuvuus olosuhteista sekä fysiologisesta tilasta tulisi ottaa paremmin huomioon tutkimusasetelmassa ja tutkittavien altain määrässä. Saatu ymmärrys tarttuville taudeille otollisista olosuhteista auttaa suunnittelemaan niiden ehkäisyyn tähtäävää jatkotutkimusta.</p> <p>Tulokset viittaavat virikkeellistämisen vähentävän Ich-loisen esiintymistä kasvatusaikana. Ich:n torjuntaan on etsitty tehokasta ja kestävää ratkaisua; virikkeellistä kasvatusapaa voisi soveltaa taudin torjumiseen muissakin makean veden kalankasvatuksen muodoissa.</p>			
Avainsanat - Nyckelord - Keywords Istukaskasvatus, Lohi, Virikeallas, Kalataudit, <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> , <i>Flavobacterium columnare</i> , <i>Trichodina</i>			
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited Eläinlääke- ja elintarviketieteiden (EE) -talon Oppimiskeskus			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktör och ledare - Director and Supervisor(s) Johtaja Antti Sukura, eläinlääketieteellisen patologian professori, Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto, Eläinlääketieteellinen tiedekunta, Helsingin yliopisto Ohjaajat Perttu Koski, ELT, erikoistutkija, Tuotanto- ja villieläinterveyden tutkimusyksikkö, Elintarviketurvallisuusvirasto, Anna-Maija Virtala, Dos. yliopistonlehtori, Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto, Eläinlääketieteellinen tiedekunta, Helsingin yliopisto			

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	1
1.1 Mitä on istukaskalakasvatus?	1
1.2 Istukastuotannon ongelmat.....	2
1.3 Vaihteleva kasvatusympäristö – lisää menestystä luonnossa ja kasvatusaikana? ..	3
1.4 Tutkielman tavoite	4
2 KIRJALLISUUSKATSAUS.....	5
2.1 Lohi (<i>Salmo salar</i>) luonnossa ja laitoksissa	5
2.1.1 Lohen ekologia	5
2.1.2 Lohen istukaskasvatus laitoksissa.....	6
2.1.3 Lohikantojen laitostumisen merkitys	7
2.2 Kasvatusympäristön vaikutus kalaan.....	8
2.2.1 Ympäristötekijät ja kalan hyvinvointi	9
2.2.2 Stressi ja vastustuskyky	11
2.2.3 Virikekasvatuksen vaikutukset kalaan	12
2.3 Tarttuvat lois- ja bakteeritaudit istukaskasvatuksessa Suomessa.....	14
2.3.1 Tartuntatautien merkitys kalankasvatuksessa.....	16
2.3.2 <i>Trichodina</i> -tyyppi	17
2.3.3 <i>Apiosoma</i> -tyyppi	18
2.3.4 <i>Chilodonella spp.</i>	18
2.3.5 <i>Ichthyobodo necator</i>	20
2.3.6 <i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	21
2.3.7 <i>Flavobacterium columnare</i>	23
2.4 Tarttuvien tautien esiintymiseen ja tautikuolleisuuteen vaikuttavat tekijät	24
2.4.1 Kasvatusolosuhteiden vaikutus tartuntapaineeseen	25
2.4.1.1 Veden virtauksen ja vaihtuvuuden vaikutus tartuntapaineeseen.....	26
2.4.2 Kasvatusolosuhteiden vaikutus patogeenin taudinaiheutuskykyyn	27
2.4.2.1 Vastustuskyky vs. taudinaiheutuskyky	29
2.5 Yhteenvedo tarttuvien kalatautien esiintyvyyteen vaikuttavista tekijöistä	31

3 AINEISTO JA MENETELMÄT	32
3.1 Tutkimuspopulaatio ja otoskoko	33
3.2 Kasvatusaltaat ja virikealtaiden olosuhdevaihtelu.....	34
3.3 Seurattavat muuttajat	36
3.3.1 Kuolleisuus sisä- ja ulkoaltaissa	36
3.3.2 Loiskartoitus sisäaltaissa	37
3.3.3 Ich-loisen esiintyvyys ulkoaltaissa	38
3.4 Näytteenotossa ja -tutkimisessa käytetyt menetelmät	38
3.4.1 Sisäaltaiden näytteenotto.....	39
3.4.2 Ulkoaltaiden näytteenotto.....	39
3.4.3 Näytteiden tutkiminen.....	40
3.5 Aineiston käsittely ja tilastolliset menetelmät.....	40
4 TULOKSET	41
4.1 Kuolleisuus sisä- ja ulkoaltaissa.....	41
4.2 Loiskartoitus sisäaltaissa.....	47
4.3 Ich-infestaatio ulkoaltaissa.....	49
5 POHDINTA	55
5.1 Tulosten luotettavuus ja aineiston riittävyys.....	56
5.2 Tulosten tulkinta ja merkitys.....	58
5.3 Johtopäätökset ja jatkotutkimuksen tarpeet	61
6 LÄHDELUETTELO	64

1 JOHDANTO

1.1 Mitä on istukaskalakasvatus?

Kalakannat ympäri maailman ovat heikentyneet vesistöjen saastumisen, liiallisen kalastuksen ja vesivoimalaitosten rakentamisen myötä (Brown & Day 2002). Kalastus ja luonnossa elävien kalakantojen säilyminen ovatkin nykyään enenevässä määrin riippuvaisia viljely- ja istutustoiminnasta (Brown & Day 2002, Salminen ym. 2013). Jo vuosikymmenien ajan on otettu luonnosta emokaloja, haudottu niiden ja niiden jälkeläisten mädistä uusia sukupolvia, kasvatettu kuoriutuneet poikaset laitosolosuhteissa ja istutettu nuoret kalat takaisin luontoon (Koli 1984, Salminen ym. 2013). Käytännössä istukaskaloja kasvatetaan samoilla laitosviljelymenetelmillä kuin teuraaksi kasvatettavia ruokakalojakin.

Suomessa nykyisenlainen istukaskasvatus on seurausta edelleen jatkuvista velvoiteistutuksista, joilla vesivoimayhtiöt määrättiin aikoinaan korvaamaan menetetyt kalasaaliit. Vaelluskalat kärsivät vesivoimaloiden rakentamisesta, sillä jokien patoaminen tuhoaa niiden lisääntymisalueita ja estää kalojen kutunousun sekä poikasten vaeluksen merelle kasvualueilleen (Koli 1984, Marttila ym. 2014). Esimerkiksi luonnossa lisääntyvät Itämeren lohikannat ovat vähentyneet voimakkaasti: ennen jokien valjastamista vesivoiman käyttöön ainakin 34 joessamme oli lisääntyviä lohia, mutta nykyään alkuperäinen kanta lisääntyy enää Tornionjoessa ja Simojoessa (Marttila ym. 2014). Monet paikalliset lohikannat ovat siis kokonaan hävinneet (Tuunainen 1984, Marttila ym. 2014), ja niin meillä kuin maailmallakin useista kalalajeista on tullut vuosien saatossa uhanalaisia (Rassi ym. 2010). Suomessa merilohen ohella meritaimenta, järvi- taimenta, järvilohia, vaellussiikaa ja nahkiaista istutetaan luonnonvesistöihin voimayhtiöiden velvoitteena (Marttila ym. 2014).

Luontaista kalakantaa pyritään kasvattamaan tuki-istutuksin, jotta populaatiokoko vastaisi paremmin kalastuksen intensiteettiä (Tuunainen 1984, Salminen ym. 2013, Marttila ym. 2014). Istutusten tavoitteena on nykyään enenevässä määrin myös heikentyneiden tai kadonneiden kalakantojen elvyttäminen tai palauttaminen (Brown & Day 2002). Istutuksia tehdään siis kalastuksen jatkuvuuden turvaamiseksi ja luonnonkalakantojen suojelemiseksi. Merkittävin ero näiden kahden toiminnan välillä on istutettaville poikasille asetettavat tavoitteet. Ensimmäisessä tapauksessa riittää, että poikaset selviytyvät luonnossa riittävän kauan kasvaakseen saaliskokoisiksi; toisessa tapauksessa istukaskalojen olisi sopeuduttava luonnonoloihin niin hyvin, että ne saavuttaisivat suku-

kypsyyden ja muodostaisivat lisääntymiskykyisen populaation luonnossa (Brown & Day 2002).

1.2 Istukastuotannon ongelmat

Istukastuotannossa on pitkään toteutettu maailmanlaajuisesti periaatetta ”mitä enemmän istutettuja kaloja, sitä enemmän eloon jääviä kaloja”, vaikka yhä useammat tutkijat painottavat panostusta määrän sijasta istutettavien poikasten laatuun (Brown & Day 2002, Brown ym. 2003, Salvanes & Braithwaite 2006). Istutusten avulla on onnistuttu säilyttämään luonnosta hävinneitä kalakantoja ja ylläpitämään populaatioita kalastuksen tarpeisiin. Tulevaisuudessa muutokset istukastuotannossa ovat kuitenkin välttämättömiä, sillä nykymenetelmillä tulokset ovat olleet heikkoja. Istukaskalojen kuolleisuus on mitattavaa heti luontoon vapauttamisen jälkeen nälkiintymisestä ja petojen uhriksi joutumisesta johtuen: istutetuista poikasista hengissä selviää huomattavasti vähemmän yksilöitä kuin vastaavasta määrästä samanikäisiä luonnossa kasvaneita kaloja (Brown & Day 2002). Ei ole taloudellisesti eikä eettisesti kestävää tuottaa valtavia kalamääriä luontoon vapautettavaksi, jos kalanpoikaset kuolevat pian luontoon päästyään (Teixeira ym. 2007).

Istukaskasvatuksessa käytettävät perinteiset vesiviljelymenetelmät takaavat suuret kasvatusaikaiset kalamäärät (Brown ym. 2003), mutta niitä ei ole varta vasten suunniteltu luontoon palautettavien kalojen kasvattamiseen. Nykyisten menetelmien soveltuvuus istukaskasvatukseen on monilta osin kyseenalaistettu. Kasvatusmenetelmissä ei ole huomioitu laitosympäristön poikkeavuutta luonnonympäristöstä tai kasvatusympäristön vaikutusta kalan luonnollisten ominaisuuksien kehitykseen (Huntingford 2004). Useat tutkimukset osoittavat, että kalat eivät pysty kehittämään luonnossa välttämättömiä taitoja kasvatusajan virikkeettömässä, staattisessa ympäristössä (Berejikian ym. 2001, Brown ym. 2003, Braithwaite & Salvanes 2005, Salvanes & Braithwaite 2006, Araki ym. 2007).

Lisäksi evoluution valintapaineet ovat laitosolosuhteissa erilaisia kuin luonnossa (Gross 1998), joten luonnollisesta poikkeavat käyttäytymismallit lisääntyvät ja laitospopulaatiot eriytyvät geneettisesti luonnonkannoista (Frankham 2008). Kasvatuissa kalapopulaatioissa tapahtuu siis sopeutumista laitosolosuhteisiin, mikä alentaa niiden kelpoisuutta luonnossa (Araki ym. 2007). Yhtenä merkittävänä syynä istukaspoikasten heikkoon menestykseen pidetään laitospopulaatioissa vallalla olevia käyttäyty-

mismalleja, jotka luonnossa epäedullisina johtavat vapautettujen kalojen menehtymiseen (Brown & Day 2002).

Istutusten onnistuminen riippuu muun muassa kasvatustavasta (Brown & Day 2002, Teixeira ym. 2007), ja viljelytavan muutos saattaa osoittautua yhdeksi kustannustehokkaaksi tavaksi parantaa istutustuloksia. Kasvatustavojen muuttaminen luonnonmukaisemmaksi vähentää luonnonolosuhteista poikkeavaa valintapainetta (Frankham 2008) ja antaa kaloille tilaisuuden harjoittaa luonnossa tarvittavia kykyjä (Salvanes & Braithwaite 2006).

1.3 Vaihteleva kasvatustavo – lisää menestystä luonnossa ja kasvatustavasta?

Luontoa jäljittelevästä, vaihtelevan ympäristön kasvatustavasta on tehty pienen mittakaavan tutkimuksia koeolosuhteissa (Berejikian ym. 2001, Brown ym. 2003, Braithwaite & Salvanes 2005) sekä kokeellista tutkimusta tuotantomittakaavaan soveltuvilla kalamäärillä ja menetelmillä (Maynard ym. 1996, Brockmark ym. 2007). Näissä tutkimuksissa on havaittu virikkeellisellä (engl. enriched) kasvatustavalla olevan positiivisia vaikutuksia muun muassa kalojen sosiaaliseen kehitykseen, stressinsietoon, uintikykyyn ja ravinnonhankintaan, minkä oletetaan vaikuttavan myönteisesti myös istukasmenestykseen. Muutamassa tutkimuksessa on myös suoraan osoitettu, että virikkeellinen kasvatustavo lisää istukaspoikasten selviytymistä luontoon vapauttamisen jälkeen (Maynard ym. 1996, Hyvärinen & Rodewald 2013). Suunniteltaessa uudenlaista kasvatustavasta tuotannon tarpeisiin on huomioitava kustannustehokkuus suhteutettuna menetelmän vaatimaan työmäärään ja sillä saavutettavaan tulokseen (Brown ym. 2003).

Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitoksen (RKTL) Kainuun kalantutkimusasemalla on yhteistyössä Helsingin yliopiston kanssa kehitetty tuotantomittakaavaan soveltuva vaihtelevan kasvatustavojen menetelmä, virikeallaskasvatustavo (Rodewald 2013, Salminen ym. 2013), jonka vaikutuksia tutkitaan istukaspoikastuotannossa normaalisti käytettävillä kalatiheyksillä. Poikasten uinti- ja ravinnonhankintakyky on pystytty parantamaan uudella kasvatustavalla, jossa altaisiin rakennetaan suojapaikkoja ja veden virtausta sekä vedenpinnan korkeutta altaissa muunnellaan satunnaisesti (Rodewald ym. 2011, Hyvärinen & Rodewald 2013, Rodewald 2013). Lisäksi virikeallas-tutkimusprojektissa on saatu viitteitä siitä, että uusi kasvatustavo vähentäisi taimien poikasten kasvatustavasta kuolleisuutta ja loistartuntoja (Hyvärinen, henkilökohtainen tiedonanto).

Loiset ja muut taudinaiheuttajat lisäävät tuotantokustannuksia tautien ehkäisyyn ja hoitoon tarvittavien toimenpiteiden ansiosta ja aiheuttavat tappioita lisäämällä kuolleisuutta kaikissa kalankasvatuksen muodoissa (Dickerson 2006). Tarttuvia tauteja ehkäiseviä menetelmiä tuleekin jatkuvasti kehittää, jottei vaikeita taudinpurkauksia esiintyisi ja välttyttäisiin taloudellisilta menetyksiltä. Jos kasvatusympäristön vaihtelevuutta lisäämällä onnistutaan ehkäisemään istukaspoikasten heikon luonnossa selviytymisen lisäksi myös kasvatusaikaisia tuotantotappioita, uudella kasvatusmenetelmällä voisi olla mahdollisuuksia kalojen elinvoimaisuutta ja hyvinvointia parantaviin käytännön sovelluksiin muissakin kalankasvatuksen tuotantomuodoissa kuin istukaskasvatuksessa.

1.4 Tutkielman tavoite

Tämän eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielman kokeellisessa osassa seurattiin yhden kesän ajan istukaspoikasten kuolleisuutta ja tarttuvien tautien esiintymistä RKTL:n Kainuun kalantutkimusasemalla istukkaiksi kasvatettavassa vuoden ikäisessä lohipopulaatiossa. Tutkimus toteutettiin yhteistyössä Eviran, RKTL:n ja Helsingin yliopiston kanssa. Tavoitteena oli selvittää kuolleisuuden sekä loisittujen, eli loistartunnan saaneiden, kalojen osuuden ja loisinnan intensiteetin eroja tavanomaisen kasvatuksen ja virikkeellisen kasvatusmenetelmän välillä. Eroja tarkasteltiin myös emotaustaltaan luonnon- ja laitospopulaatiosta peräisin olevien kalojen välillä. Hypoteesina oli, että loisinfestaatio on vähäisempi virikkeellisellä menetelmällä kasvatetuilla kaloilla kuin tavanomaisesti kasvatetuilla, ja vastaavasti vähäisempi luonnonemojen poikasilla kuin laitosalkuperää olevilla kaloilla. Myös kokonaiskuolleisuudessa oletettiin olevan vastaavanlaiset erot ”virikealtaiden” ja tavallisten altainen sekä luonnon- ja laitospopulaatioiden välillä.

Tutkielman kirjallisuuskatsauksessa perehdytään siihen, kuinka kasvatusympäristö ja kalakantojen laitostuminen voivat vaikuttaa istukkaiden kasvatusaikana merkittävimpien tautien esiintymiseen ja kasvatusaikaiseen kuolleisuuteen. Katsauksessa kartoitetaan luonnon- ja laitosympäristön eroja ja ympäristötekijöiden vaikutusta kalaan, esitellään istukaskasvatuksessa merkittävimmät tarttuvat taudit ja loiset sekä pohditaan näiden tautien esiintymiseen vaikuttavia tekijöitä ja sairastumiseen johtavia olosuhteita. Tutkielman tavoitteena on selvittää kasvatusympäristön roolia kasvatusaikaisen loistartuntojen ja kuolleisuuden vähentämisessä.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

Jotta voidaan tarkastella istukaskasvatuksessa kasvatusympäristön ja kalakantojen laistumisen vaikutuksia joukkosairastumisia ja kuolleisuutta aiheuttavien tarttuvien tautien esiintymiseen, on ensin ymmärrettävä peruseriaatteen tarkasteltavan lajin ekologiasta ja ympäristön vaikutuksista kalaan sekä lähtökohdat luontoa mukailevan, virikkeellisen kasvatusympäristön kehittämiseksi. Tämän kirjallisuuskatsauksen ensimmäisessä ja toisessa osiossa esitellään tutkielman kannalta keskeiset käsitteet sekä käsitellään lyhyesti luonnonmukaisen kasvatusympäristön vaikutuksista tehtyä tutkimusta. Näissä osiossa pyritään vastaamaan kysymykseen: kuinka kasvatusympäristö vaikuttaa kalaan.

Katsauksen kolmas ja neljäs osio keskittyvät lohien istukaskasvatuksessa esiintyviin tarttuviin tauteihin ja tekijöihin, jotka vaikuttavat niiden esiintymiseen. Olemassa olevan tutkimustiedon perusteella pyritään vastaamaan kysymykseen: kuinka kasvatusympäristö vaikuttaa tautien ja kuolleisuuden esiintymiseen. Kokonaisuutena tämä kirjallisuuskatsaus pohtii aikaisemman tutkimustiedon valossa olosuhteita, jotka vaikuttavat lohien, ja soveltuvin osin muiden istukkaiksi kasvatettavien kalojen, terveyteen ja menestykseen kasvatusaikana.

2.1 Lohi (*Salmo salar*) luonnossa ja laitoksissa

Kehitettäessä istukaskasvatusmenetelmiä on olennaista perehtyä luontoon palautettavaksi kasvatettavan lajin ekologiaan (Brown & Day 2002). Lajityypilliset olosuhdevaativatukset ja käyttäytymistarpeet on tunnettava, jotta voidaan ymmärtää ja pyrkiä hallitsemaan laitosympäristön vaikutuksia kalapopulaatioon. Seuraavissa kappaleissa esitellään tutkielman kannalta olennaisin osin lohien ekologiaa ja laitostasvatusta.

2.1.1 Lohien ekologia

Lohi vaatii elinympäristöltään viileää, puhdasta, hapekasta ja hyvälaatuista vettä, ja viettää ensimmäiset vuodet elämästään synnyinkoskessaan (Tuunainen 1984). Mäti talvehtii soran seassa kutupaikalla, poikaset kuoriutuvat keväällä ja ne elävät ruskuaispussissaan olevan vararavinnon turvin soraikossa useita viikkoja. Kesän tullen lohien aktiivisuus kasvaa ja ne siirtyvät vapaaseen veteen kosken matalikkoon. Ravintonaan lohi käyttää koskivaiheessa mm. eläinplanktonia, selkärangattomia ja hyönteisiä. Poikasten kasvaessa myös niiden käyttämän ravinnon koko suurenee ja lohet siirtyvät kosken syvempiin osiin, missä virtaus on voimakas (Tuunainen 1984). Jokaisella yksilöllä on

koskessa oma reviiirinsä, jota vartioidaan ja puolustetaan aggressiivisesti (Keenleyside & Yamamoto 1962). Reviirit takaavat riittävän ravinnonsaannin – kullakin alueella on vain tietty määrä reviiirejä, joten kosken poikastuotantokapasiteetti on rajallinen (Tuunainen 1984). Talvella kylmän veden aikaan poikaset ovat passiivisia ja siirtyvät virtaukselta suojaan kivikkoihin (Tuunainen 1984).

Lohien saavuttaessa vaelluskoon (12 – 20 cm) tapahtuu ns. smolttiutuminen eli poikasen ulkonäkö, aineenvaihdunta ja käytös muuttuvat: syntyy vaelluspoikainen eli smoltti (Tuunainen 1984). Veden lämpötilan ollessa keväällä 10 – 12 °C smoltit lähtevät vaeltamaan parvissa kohti merellä sijaitsevaa syönnösalueuttaan eli aluetta, jolla lohet oleskelevat kutuaikojen välisen ajan ja jossa niiden kasvu pääosin tapahtuu. Lohet vaeltavat syönnösalueilleen saaliidensa, silakka- ja kilohailiparviin perässä. Vietettyään vuoden tai useamman merellä, lohet lähtevät alkukeväästä vaeltamaan takaisin synnyinkoskiinsa, jotka ne tunnistavat hajuaistin perusteella. Kutu tapahtuu syksyllä kotikoskessa (Tuunainen 1984).

2.1.2 Lohen istukaskasvatus laitoksissa

Lohikannat tarvitsevat luonnossa menestyäkseen esteettömän pääsyn synnyinkoskistaan jokiin ja mereen sekä takaisin mereltä koskiin kutemaan (Tuunainen 1984). Jokien valjastaminen vesivoiman käyttöön Suomessa ja maailmalla on jo vuosikymmenten ajan estänyt useiden lohikalakantojen luonnollisen lisääntymisen (Koli 1984). Lohen tuotanto kalastuksen tarpeisiin on pitkään perustunut emokaloiden kasvatukseen laitosolosuhteissa ja viljeltyjen vaelluspoikasten istutuksiin (Tuunainen 1984, Salminen ym. 2013).

Istukaskasvatuksessa käytettävät menetelmät on kehitetty kaupallisen, makean veden ruokakalankasvatuksen pohjalta. Perinteisessä laitосkasvatuksessa on yleensä mahdollista käyttää samanlaatuista vettä ja vastaavia valaistusolosuhteita kuin luonnossa, mutta muun muassa ravinnon jakautuminen, kalatiheys ja veden virtaus poikkeavat luonnonympäristöstä (Waples 1999). Laitosoloissa käytetään esimerkiksi muovi- ja betonialtaita, joissa ei ole minkäänlaisia suojapaikoiksi soveltuvia sisärakenteita, ja kalatiheydet ovat suurempia ja vedenvirtaus hitaampi kuin luonnossa (Brown & Day 2002). Laitoksissa kaloja ruokitaan teollisilla pelleteillä, joten ravinnon saannissa ei ole ajallista, paikallista, määrällistä tai laadullista vaihtelua (Brown & Day 2002). Kallat joutuvat laitoksissa myös normaalia enemmän tekemisiin ihmisen ja lajitoveriensa kanssa (Huntingford 2004).

Luonnonympäristö on vaihteleva, kun taas laitoksissa ympäristö on yksinkertainen ja tila rajoitettu, joten vaellus paikasta toiseen ei ole mahdollista (Huntingford 2004). Laitoksen petovapaa ympäristö, jossa ruokaa on riittävästi tarjolla, auttaa poikasia selviytymään laitoksissa, mutta ei valmista niitä luonnonoloihin, missä poikasten tulisi oppia löytämään sopivaa ravintoa ja välttämään petoja (Salvanes & Braithwaite 2006). Perinteiset kasvatusaikaisen menestyksen maksimointiin tähtäävät menetelmät muokkaavat kaloista käytökseltään kehittymättömiä ja haittaavat istukkaiden selviytymistä luonnossa (Brown ym. 2003).

Laitoksissa kasvaneiden kalojen huono menestys luonnossa on ollut tiedeyhteisön tiedossa jo vuosisadan: istutusten tulokset ovat olleet pääsääntöisesti heikkoja maailmanlaajuisesti, istutustulosten seuranta on yleensä ollut puutteellista eikä istukkuusolosuhteiden syitä ole useinkaan selvitetty perusteellisesti (Brown & Day 2002, Salminen ym. 2013). Suomessa viimeisten parin vuosikymmenen aikana lohi-istutusten tuloksiin on todettu vaikuttaneen kalojen vaellus- ja elinkykyä heikentäneet muutokset kalastuksessa, Itämeren ekologiassa, lohenpoikasten laadussa sekä istutuskäytännöissä (Salminen ym. 2013). Ratkaisuja istutustulosten parantamiseen on alettu etsiä muuttamalla kasvatusaikaisia olosuhteita ja kiinnittämällä huomiota istukkaiden geeniperimään (Brown & Day 2002, Salminen ym. 2013).

2.1.3 Lohikantojen laitostumisen merkitys

Valtaosa nykyisestä maailmanlaajuisesta lohipopulaatiosta elää laitoksissa (Gross 1998) luonnonpopulaatioiden uhanalaistuessa ja kuollessa sukupuuttoon. Luonnossa kalojen on vältettävä saalistusta, etsittävä ravintoa ja kilpailtava reviereistä, kun taas laitoksissa kaloja ruokitaan, käsitellään ja niiden liikkumista rajoitetaan (Gross 1998). Laitosympäristö eroaa huomattavasti lohien luonnossa kohtaamista olosuhteista, minkä vuoksi laitospopulaatioiden emokalastoissa on tapahtunut domestikaatiovalinnan myötä geneettistä eriytymistä luonnonpopulaatioista (Gross 1998, Waples 1999). Tämä johtaa eroihin villien ja kasvatettujen kalojen välillä mm. ravinnonkäsittelyssä, saalistuskäyttäytymisessä, riskinotossa, petojen välttämisessä, aggressiivisuudessa ja kutukäyttäytymisessä (Huntingford 2004). Tyypillisesti esimerkiksi laitostokannoilla kasvunopeus suurenee ja sukukypsyyksikään alenee (Salminen ym. 2013).

Geneettinen sopeutuminen kasvatusoloihin tapahtuu suuntaavan valinnan kautta: kasvatusympäristössä menestyvät genotyyppiltään erilaiset kalat kuin luonnossa, joten vankeudessa lisääntyvät luonnossa harvinaiset – ja usein haitalliset – alleelit

(Frankham 2008). Ideaalitulanteessa luonnosta voitaisiin ottaa jatkuvasti uusia emokaloja, jolloin geneettisellä monimuotoisuudella olisi edellytykset säilyä luonnonpopulaation tasolla; kalanpoikasten kasvatusaikaista menestystä on kuitenkin lisätty myös tietoisella emokalojen valinnalla (Brown & Day 2002). On syntynyt kasvatusoloihin sopeutuneita lohikantoja, jotka ovat geneettisesti erilaisia kuin luonnon valintapaineiden muokkaamat, luonnonoloihin sopeutuneet populaatiot (Gross 1998).

Jo muutama vankeudessa kasvanut sukupolvi vähentää lisääntymismenestystä luonnossa (Araki ym. 2007), mikä on ongelmallista istukaskasvatuksen tavoitteet huomioon ottaen. Esimerkiksi Suomessa luonnonalkuperää olevien lohien vaelluspoikasten eloonjäänti on ollut viime vuosina kolminkertainen viljeltyjen kalojen jälkeläisiin verrattuna (Marttila ym. 2014). Laitosoloihin sopeuttava suuntaava valinta voidaan minimoida tekemällä kasvatusympäristöstä luonnonympäristön kaltainen (Frankham 2008). Haasteena onkin kehittää istukaskasvatusmenetelmä, jolla voidaan varmistaa menestys niin kasvatusaikana kuin luonnossa.

2.2 Kasvatusympäristön vaikutus kalaan

Vaihtelevan kasvatusympäristön vaikutusten tutkiminen kalankasvatuksessa on lähtöisin tarpeesta kasvattaa luontoon paremmin sopeutuvia istukkaita. Viimeisten reilun kymmenen vuoden aikana useat tutkimusryhmät ovat kehitelleet virikkeellisiä kasvatusolosuhteita, joissa erilaisia piilopaikkoja, veden virtausta ja ravinnon jakautumista muuntelemalla pyritään muokkaamaan laitosympäristöstä luonnonmukaisempaa. Koeasetelmissa on pääasiassa selvitetty ympäristön virikkeellistämisen vaikutusta ominaisuuksiin, joiden oletetaan parantavan istukkaiden menestystä luonnossa: kalan oppimista ja uintikykyyn, ravinnonhankintaan, sosiaaliseen käytökseen ja petojen välttämiseen (Brown ym. 2003, Braithwaite & Salvanes 2005, Anttila ym. 2006, Salvanes & Braithwaite 2006). Suuri osa virikeallastutkimuksista on toteutettu pienessä mittakaavassa koeolosuhteissa, joissa tiheydet eivät vastaa istukaskasvatuksessa todellisuudessa käytettäviä kalamääriä. Virikeallaskasvatuksen vaikutuksia on kuitenkin tutkittu myös tuotantomittakaavassa (Maynard ym. 1996, Brockmark ym. 2007, Rodewald 2013).

Tutkimusnäyttöä kasvatusympäristön virikkeellistämisen vaikutuksesta kalojen kasvatusaikaiseen menestykseen on vaikeampi löytää: uudenlaisia virikkeellisiä ympäristöjä ei ole kokeellisesti tarkasteltu suoraan tästä näkökulmasta. Kalatiheyksien, ravinnon jakautumisen, veden laadun ja virtauksen, kalojen käsittelyn ynnä muiden laitosolosuhteiden vaikutuksia kalan reviirikäyttäytymiseen, stressiin ja vastustuskykyyn

on kuitenkin tutkittu jokseenkin laajasti (Pickering & Pottinger 1989, McDonald ym. 1998, Reddy & Leatherland 1998). Lisäksi esimerkiksi Pohjoismaissa on pitkät perinteet lohitutkimuksella, jolla selvitetään kasvatusaikaisten ympäristötekijöiden – pääasiassa veden virtauksen muuntelun ja sillä aikaansaadun fyysisen kunnon treenaamisen – vaikutuksia kasvuun ja selviytymiseen laitoksessa ja luonnossa (Johansson & Svensson 1977, Anttila ym. 2006). On myös näyttöä siitä, että veden virtausta muuntelemalla voidaan vaikuttaa kasvatusaikana kaloilla esiintyvien loistautien määrään (Johansson & Svensson 1977, Bodensteiner ym. 2000).

Tämän kirjallisuuskatsauksen viimeinen osio keskittyy pohtimaan ympäristöolosuhteiden vaikutusta kasvatusaikaiseen kuolleisuuteen ja kalatautien esiintyvyyteen. Ensin kuitenkin tarkastellaan, mitkä ympäristötekijät vaikuttavat kalan ominaisuuksiin ja mikä on kyseisten vaikutusten merkitys kalan kasvatusaikaisen menestyksen, hyvinvoinnin ja vastustuskyvyn kannalta. Tähän aihepiiriin liittyvää tutkimusta on tehty runsaasti useilla kalalajeilla. Seuraavissa kappaleissa esitettävät periaatteet pätevät makean veden vesiviljelyssä käytettyihin lajeihin, joihin lohikalojen istukaspoikaset kuuluvat. Myös lohien erityispiirteet huomioidaan tässä katsauksessa.

2.2.1 Ympäristötekijät ja kalan hyvinvointi

Ympäristön vaikutukset kalan hyvinvointiin ja vastustuskykyyn voi kiteyttää yhteen lauseeseen: kalan hyvinvoinnin heikentyessä sen vastustuskyky alenee (Rahkonen ym. 2012). Kalan hyvinvointiin vaikuttavat monet toisistaan riippuvat tekijät, jotka voivat poiketa laitoksissa huomattavasti luonnonoloista. Optimaalinen veden happipitoisuus, lämpötila ja pH sekä alhainen ammoniakki-, myrkky- ja kiintoainepitoisuus ovat tärkeitä kalan hyvinvoinnille (Rahkonen ym. 2012). Kalankasvatuslaitoksilla käytettävä vesi on yleensä peräisin luonnonvesitöstä, jolloin sen lämpötila ja koostumus mukailee paikallisia sää- ja ympäristöolosuhteita. Laitokseen tulevan veden laatuun voidaan vaikuttaa vettä suodattamalla, hapettamalla sekä säätelemällä ottoputken syvyyttä lähdevesitöissä.

Vaihtolämpöisenä eläimenä kala on herkkä lämpötilan muutoksille: aineenvaihdunta ja puolustusjärjestelmän toiminta hidastuvat kylmässä ja vastaavasti kiihtyvät lämpimässä vedessä (Rahkonen ym. 2012). Kalan hapenkulutus muuttuu ruokakulutuksen ja aktiivisuuden mukaan: mitä lämpimämpää vesi on, sitä hapekkaampaa sen myös tulee olla vastatakseen kiihtyneen aineenvaihdunnan tarpeita (Rahkonen ym. 2012). Hapen puute hidastaa kalojen kasvua ruokahalun ja rehunkäytön tehokkuuden

heikentyessä (Rahkonen ym. 2012). Vedessä olevan hapen määrään vaikuttaa mm. siinä oleva happea kuluttava eloperäinen aines (Rahkonen ym. 2012).

Lohikalolle optimaalinen vedenlaatu on erittäin hapekas (8 mg/l), noin 16-asteinen eli viileä vesi, jonka pH pysyy tasaisena lajeille suotuisan pH alueen (6,5 – 8,0) puitteissa (Rahkonen ym. 2012). Esimerkiksi levätuotanto altaassa voi aiheuttaa suuria pH-vaihteluja (Rahkonen ym. 2012). Veden pH vaikuttaa kalojen erittämän ammoniakkin myrkyllisyyteen: pH:n kasvaessa myrkyllisen, vapaan muodon osuus altaassa olevasta ammoniakista lisääntyy (Rahkonen ym. 2012). Ammoniakin haitallisuus korostuu tiheissä parvissa, joissa veden vaihtuvuus on hidasta (Rahkonen ym. 2012). Kasvattamalla hyvälaatuisen veden virtausnopeutta altaassa happipitoisuus pysyy korkeana ja metaboliatuotteet poistuvat nopeasti (Reddy & Leatherland 1998).

Veteen sekoittuvat kiinteät aineet, kuten ulosteet, levä ja humus, tarttuvat hiukkasina kiduksiin ja aiheuttavat hengitysvaikeuksia (Rahkonen ym. 2012). Suurina pitoisuuksina raskasmetallit ja erilaiset kemikaalit ovat kaloille haitallisia (Rahkonen ym. 2012). Myös valaistuksella ja valorytmillä on merkitystä kalan hyvinvoinnille (Rahkonen ym. 2012). Onkin muistettava, että olosuhteet ovat kalalle paljon muutakin kuin veden fysikaalisia ominaisuuksia: tilan ajallinen ja paikallinen muuntelu, esimerkiksi vaihtelu ravinnon jakautumisessa ja veden virtauksessa, vaikuttavat kalaan ja muokkaavat sen fenotyyppiä eli ilmiä (Salvanes & Braithwaite 2006).

Kasvatustiloissa kaloja ruokitaan tehdasvalmisteisilla rehuilla (Rahkonen ym. 2012). Ruokinta tapahtuu käsin pudottamalla rehua altaisiin tai altaissa käytetään kiinteää annostelijaa, josta vapautuva rehu leviää altaaseen veden virtauksen mukana. Ruokinnassa tärkeää on oikea ajoitus ja sopiva ruoan raekoko sekä sellainen veden virtaus, jolla ruoka saavuttaa altaassa olevat kalat (Rahkonen ym. 2012). Lohelle lajityypillisen, ravintoon liittyvän revierikäyttäytymisen (Keenleyside & Yamamoto 1962) arvellaan mahdollistuvan vain käytettäessä tavallista alhaisempia kasvatustiheyksiä (McDonald ym. 1998).

Kalan ruumiinkuntoa säätelevät aktiivisuustaso ja ravinto sekä toki sairaudet ja muut yleiskuntoon vaikuttavat olosuhdetekijät. Lihaskuntoon ja uintikykyyn vaikuttaa mm. veden virtausnopeus altaassa (Anttila ym. 2006). Aliravitseminen heikentää yleiskuntoa ja vastustuskykyä, ja ylikuormitus puolestaan altistaa rasvoittumiselle sekä aineenvaihdunnan kiihtymisestä johtuvalle hapenpuutteelle (Rahkonen ym. 2012).

2.2.2 Stressi ja vastustuskyky

Stressi auttaa eläintä sopeutumaan elimistön tasapainoa uhkaaviin tapahtumiin, mutta kroonistuessaan se aiheuttaa haittavaikutuksia (Teixeira ym. 2007). Neuroendokriinisessa aktivaatiossa vapautuu katekoliamiineja ja kortikosteroideja, jotka aiheuttavat fysiologiset stressivasteet, kuten sykkeen nousun ja energiavarastojen mobilisaation (Reddy & Leatherland 1998). Pitkään kestäessään fysiologisten vasteiden seurauksena elimistön toiminnoissa tapahtuu muutoksia: esimerkiksi kasvu hidastuu ja immuunipuolustus heikkenee (Reddy & Leatherland 1998).

Kalan vastustuskyky perustuu ihon ja limakalvojen muodostamaan ulkoiseen esteeseen sekä synnynnäisen ja hankitun immuunipuolustuksen toimintaan (Rahkonen ym. 2012). Kroonisen stressialtistuksen ansiosta plasman kortisolitaso pysyy koholla, mikä aiheuttaa lymfositopenian, laskee immunoglobuliinien tuotantoa ja estää prostaglandiinin aktiivisuutta (Reddy & Leatherland 1998): näin pitkittynyt stressi alentaa kalan vastustuskykyä merkittävästi. Kalan vastustuskykyyn vaikuttavat myös suoraan – ja epäsuorasti stressin välityksellä – kalan kunto, veden laatu ja lämpötila, sairaudet, lääkitykset ja hormonit (Rahkonen ym. 2012).

Laitosympäristössä moni tekijä aiheuttaa kalalle stressiä (Rahkonen ym. 2012). Käsittely, hoitotoimenpiteet ja kuljetus aiheuttavat lyhytaikaista stressiä, josta kala toipuu muutamassa päivässä (Pickering & Pottinger 1989). Kroonista stressiä voivat aiheuttaa mm. suuri kalatiheys ja rajoitettu liikkumatila (Pickering & Pottinger 1989), huono veden laatu ja muutoin epäsuotuisat olosuhteet (Rahkonen ym. 2012) sekä sosiaalinen vuorovaikutus, jossa alisteiset kalat kärsivät, kun laitosympäristö ei mahdollista pakenemista ja piiloutumista (Reddy & Leatherland 1998). Lohi on erittäin aggressiivinen ja territoriaalinen laji, jonka luontainen ravinnonhankintaan liittyvä reviirikäyttäytyminen kuitenkin vaimenee kalatiheyksien kasvaessa suuriksi (Keenleyside & Yamamoto 1962). Stressiä aiheutuu, kun mahdollisuus lajityypilliseen käyttäytymiseen estyy (Teixeira ym. 2007). Toisaalta jos energiaa kuluu ”yltäkylläisissä” kasvatusoloissa turhaan voimakkaaseen reviirikäyttäytymiseen, voi kalan kasvu ja immuunipuolustuksen toiminta heikentyä (Reddy & Leatherland 1998).

Uuteen ympäristöön sopeutuminen aiheuttaa aina stressiä (Teixeira ym. 2007). Stressin voimakkuus ja pitkäkestoisuus riippuvat siitä, kuinka kala voi vallitsevissa olosuhteissa sopeutua sietämäänsä stressiä ja mukautumaan ympäristön vaihteluun (Braithwaite & Salvanes 2005). Perinteiseen staattisen ympäristön vesiviljelyyn verrattuna ympäristön muuntelu voikin olla virikkeellisen kasvatuksen mukanaan tuoma uusi

stressori – tai toisaalta stressinsietoon sopeuttava tekijä. Stressin vaikutuksia kalan vastustuskykyyn ja kasvatusaikaiseen menestykseen tarkastellaan myöhemmin tässä kirjallisuuskatsauksessa.

2.2.3 Virikekasvatuksen vaikutukset kalaan

Perinteinen kasvatusympäristö ei mahdollista luonnossa välttämättömän käytöksen kehittymistä (Salvanes & Braithwaite 2006). Taito etsiä ravintoa ja välttää petoja vaatii joustavaa reagointia, oppimista ja sopeutumista uusiin tilanteisiin ja ympäristöihin (Braithwaite & Salvanes 2005, Teixeira ym. 2007). Tämän takia on ryhdytty tutkimaan, kehittääkö virikkeellinen kasvatusympäristö ominaisuuksia, joita luontoon sopeutuminen vaatii. Sen sijaan ei ole juurikaan tutkittu, kuinka virikkeellinen ympäristö vaikuttaa kalan kasvatusaikaiseen menestykseen.

Berejikian ym. (2001) osoittivat virikkeellisen ympäristön stimuloivan kirjolohen luonnollista reviirikäyttäytymistä. Virikkeinä tutkimuksessa käytettiin altaan peittäviä, veteen ulottuvia puusta ja verkosta muodostuvia katteita sekä veden alle asennettuja ruokinta-automaatteja (Berejikian ym. 2001). Koeasetelmasta johtuen ravinto jakautui tasaisemmin virikkeellisissä altaissa kuin perinteisissä altaissa, minkä merkitystä reviirikäyttäytymisessä havaittuihin eroihin tekijät eivät kuitenkaan ole pohtineet laajasti.

Brown ym. (2003) havaitsivat virikkeellistetyn ympäristön vaikuttavan suotuisasti lohen oppimiskykyyn akvaario-olosuhteissa, joihin oli lisätty runsaasti erilaisia sisustusmateriaaleja: soraa, eläviä ja keinokasveja, kiviä, puunkappaleita ja muoviputkia. Tutkimusasetelma oli kuitenkin puutteellinen, koska varsinaista kontrollikäsitteilyä ei ollut, joten johtopäätösten tekeminen ja tulosten vertailu muihin tutkimuksiin ei ole mahdollista.

Braithwaite ym. (2005) tutkivat vaihtelevan ympäristön vaikutuksia hiekan laajemmassa mittakaavassa. Koeasetelmassa perinteisiin kasvatusaltaisiin lisättiin kiviä ja muovista merilevää, joiden paikkoja vaihdeltiin satunnaisesti, ja ravinnon jakautumista altaissa muunneltiin kokeen ajan. Tutkimuksessa todettiin ympäristön yksinkertaisen virikkeellistämisen monipuolistavan turskanpoikasten käyttäytymistä ja vaihtelevassa ympäristössä kasvatettujen kalojen toipuvan nopeammin lyhytaikaisesta stressistä. Kontrollina käytetyssä, perinteisessä staattisessa kasvatusmenetelmässä todettiin kalojen kasvavan nopeammin ja suuremmiksi kuin virikkeellisellä menetelmällä (Braithwaite & Salvanes 2005).

Vaihtelevan kasvatusympäristön, jossa suojapaikat peittivät n. 75 % altaan pinta-alasta on osoitettu vaikuttavan lohepoikasten aivojen toimintaan ja parantavan oppimiskykyä (Salvanes ym. 2013). Salvanesin ym. (2013) virikekäsittely kesti 8 viikkoa, jona aikana virike- ja standardikäsittelyjen välillä ei havaittu eroa kalojen koossa.

Kaikissa edellämainituissa tutkimuksissa kalatiheydet ovat olleet huomattavasti pienempiä kuin istukaskasvatuksessa todellisuudessa käytettävät kalamäärät ja virikkeellinen kasvatus on aloitettu kesken kalojen eliniän. Ongelmallista on myös saman koejärjestelyn aikana useiden erilaisten virikemateriaalien sekä eri ruokintatapojen käyttö, joka vaikeuttaa johtopäätösten tekemistä sekä tutkimusten keskinäistä vertailua. Lisäksi eri kalalajeilla saadut tulokset eivät lajien erilaisesta biologiasta johtuen ole välttämättä vertailukelpoisia.

Maynard ym. (1996) ovat tutkineet virikkeellisyyttä kuningaslohen istukaskasvatuksessa tuotantomittakaavan kalatiheyksillä. Sora, kasvit, verkkokatokset ja ravinnon jakautumisen muuntelu altaissa olivat viriketekijöitä, jotka otettiin käyttöön kasvatuksen muutaman viimeisen kuukauden aikana. Virikkeellisellä menetelmällä kasvatettujen poikasten havaittiin olevan suojaväriytykseltään monimuotoisempia kuin perinteisellä menetelmällä kasvatettujen, ja selvästi suurempi osa virikkeellisesti kuin tavanomaisesti kasvatetuista poikasista säilyi hengissä luontoon vapautuksen jälkeen (Maynard ym. 1996).

Rodewaldin ym. (2011, 2013) virikeallastutkimukset on toteutettu Itämeren lohen istukastuotantoa vastaavilla kalatiheyksillä, tutkitut kalat ovat olleet virikekasvatuksessa koko elämänsä ajan ja tutkimuksissa on huomioitu myös poikasten erilainen geneettinen alkuperä (villi- & laitoskanta). Virikkeinä käytettiin erilaisia muovista, kivistä ja tiilistä rakennettuja altaisiin asetettuja suojapaikkoja sekä veden virtauksen ja ravinnon jakautumisen ja koon satunnaista muuntelua. Virikkeellisyyden havaittiin parantavan lohen syöntikykyä, oppimista ja suojautumiskäyttäytymistä pedon läsnäollessa (Rodewald ym. 2011, Rodewald 2013). Lisäksi virikepoikaset selviytyivät luonnossa tavanomaisella menetelmällä kasvatettuja paremmin (Hyvärinen & Rodewald 2013).

Brockmark ym. (2007, 2010) sekä Brockmark väitöskirjassaan (2009) käsittelevät kasvatustiheyden ja virikkeellisen kasvatuksen vaikutusta taimenistukkaiden ominaisuuksiin. Myös he käyttivät tuotantomittakaavan kalatiheyksiä, mutta virikerakenteet olivat erilaisia ja niiden vaikutukset pienempiä kuin Rodewaldin ym. (2011, 2013) tutkimuksissa. Virikkeet olivat revityistä, vihreistä muovipusseista ja kivistä tehtyjä suojapaikkoja, jotka vaihdettiin kolmen päivän välein. Virikekasvatuksessa taime-

net olivat suurempikokoisia ja paremmassa kuntoluokassa kuin tavanomaisella menetelmällä kasvatetut kalat, mutta etenkin korkeissa kasvatustiheyksissä virikkeellisyyden ei havaittu vaikuttaneen taimenten ominaisuuksiin (Brockmark ym. 2007). Sen sijaan kasvatustiheyden harventamisen osoitettiin vaikuttavan voimakkaasti kalan ilmiäsuun: luonnonmukainen, alhainen kalatiheys edisti kasvua ja sosiaalisen käytöksen kehitystä, paransi ravinnonhankintaa sekä petojen välttämiseen liittyvää käytöstä ja lisäsi selviytymistä luonnossa (Brockmark ym. 2007, Brockmark ym. 2007, Brockmark 2009, Brockmark & Johnsson 2010).

Koska edellä mainituissa tutkimuksissa on samanaikaisesti käytetty useita eri virikkeellistämismenetelmiä, tiettyjen ympäristötekijöiden vaikutuksia kalan tiettyihin ominaisuuksiin, ja mekanismeja näiden vaikutusten taustalla, on tällaisilla koejärjestelyillä vaikea arvioida. On kuitenkin tutkittu, kuinka veden virtaus ja ravinnon jakautumisen vaihtelu vaikuttavat kalan kuntoon kasvatusaikana (McDonald ym. 1998, Anttila ym. 2006). McDonald ym. (1998) esittävät, että matalissa kalatiheyksissä lohien ravinnonkulutus lisääntyy ja kalat kasvavat suuremmiksi kuin perinteisissä tiheyksissä, johtuen luonnolliseen ravinnonhankintaan liittyvän reviirikäyttäytymisen (Keenleyside & Yamamoto 1962) mahdollistumisesta. Anttila ym. (2006) osoittivat tietyllä nopeudella virtaavan veden tehostavan optimaalisesti lohien lihasten aineenvaihduntaa. Virtaavassa vedessä uimisen on todettu kasvattavan lohien kuntoa, uintikykyä ja kestävyyttä (McDonald ym. 1998, Anttila ym. 2006). Suuri koko ennustaa kasvatettujen lohien parempaa selviytymistä luonnossa (Kallio-Nyberg ym. 2004). Ruumiinkunnon merkitys kasvatusaikaiseen ja sen jälkeiseen menestykseen on kuitenkin monimutkainen, ja aiheeseen palataan myöhemmin tässä katsauksessa.

2.3 Tarttuvat lois- ja bakteeritaudit istukaskasvatuksessa Suomessa

Patogeenit, jotka elävät luonnonpopulaatioissa tasapainossa isäntälajiensa kanssa, voivat kasvatusolosuhteissa johtaa laajoihin taudinpurkauksiin (Scholz 1999). Tartuntatautien esiintymiseen vaikuttavien tekijöiden ja taudinpurkausten syiden tarkastelemiseksi on tunnettava taudinaiheuttajien ekologia ja epidemiologia sekä taudinaiheutuskyky ja -mekanismit. Laajasta tutkimuksesta huolimatta istukaskasvatuksessa merkittävien taudinaiheuttajien osalta tarkat patogeenimekanismit ja virulenssitekijät ovat monin paikoin epäselviä.

Istukaskalakasvatuksessa esiintyvien lois- ja bakteeritautien osalta tunnetaan hyvin muun muassa taudinaiheuttajan morfologiset ominaisuudet, sairauden oireet

kalassa, empiirisesti tutkitut, käytössä olevat hoitomenetelmät sekä tautien esiintyvyyden ennustettavuus ja vuodenaikaisvaihtelu (Tavolga & Nigrelli 1947, Valtonen & Koskivaara 1994, Rintamäki-Kinnunen & Valtonen 1997, Rintamäki-Kinnunen ym. 2005, Picón-Camacho ym. 2012). Paljon tutkimusta on suunnattu myös patogeeni-isäntä - vuorovaikutukseen (Robertson 1979, Kunttu 2010, Wei ym. 2013) sekä erityisesti vuosituhannen vaihteen jälkeen enenevässä määrin immuniteettiin ja rokotekehittelyyn (von Gersdorff Jorgensen ym. 2012, Dickerson & Findly 2014).

Seuraavissa kappaleissa tarkastellaan aiempaan tutkimustietoon perustuen suomalaisessa lohikalojen istukaskasvatuksessa yleisimpiä loisia sekä merkittävimpiä taudinaiheuttajia. Koska kattava esittely Suomessa kalankasvatuksessa esiintyvistä tarttuvista taudeista on julkaistu toisaalla (Rahkonen ym. 2012), keskitytään tässä katsauksessa vain lisensiaatin tutkielman kokeellisen osan kannalta tärkeimpiin taudinaiheuttajiin. Näihin kuuluvat yksi patogeeninen bakteeri *Flavobacterium columnare*, kolme patogeenistä alkueläinloissukua *Ichthyophthirius multifiliis*, *Ichthyobodo necator* ja *Chilodonella spp.* sekä yleisesti esiintyvät *Trichodina* ja *Apiosoma* -alkueläimet, jotka aiheuttavat tautia vain poikkeustilanteissa. Alkueläimet ovat yksi merkittävimmistä villien ja laitoskalojen patogeeneista maailmanlaajuisesti (Scholz 1999) ja flavobakteerit puolestaan ovat viime vuosina olleet eniten haittaa aiheuttavia bakteereja suomalaisessa kalanviljelyssä (Suomalainen ym. 2005).

Istukaskasvatuslaitoksissa esiintyvät loiset ovat pääosin mikroskooppisia alkueläimiä, jotka eivät vaadi monimutkaista elämänkiertoa lisääntyäkseen, sillä istukaslaitoksiin pääsee taudinaiheuttajia enimmäkseen tuloveden välityksellä luonnon vesistöistä (Valtonen & Koskivaara 1994). Tämän vuoksi muun muassa imu- ja heisimatoja ei juuri esiinny istukaskasvatuksessa (Rahkonen ym. 2012). Myöskään merivedessä elävät taudinaiheuttajat eivät ole ongelmana istukasviljelyssä, sillä kasvatuslaitokset sijaitsevat sisämaassa. Makeassa vedessä istukasviljelylaitoksilla voidaan tavata edellisessä kappaleessa mainittujen lisäksi muun muassa *Gyrodactylus salaris* -loista ja *Aeromonas salmonicida* (furunkuloosi), *Renibacterium salmoninarum* (bakteeriperäinen munuaistauti) sekä *Flavobacterium psychrophilum* (kylmän veden tauti) -bakteereja. Rahkonen ym. (2012) esittelevät teoksessaan nämä ja muut kirjallisuuskatsauksen ulkopuolelle jäävät tarttuvat taudit, joita voi esiintyä suomalaisessa kalankasvatuksessa.

2.3.1 Tartuntatautien merkitys kalankasvatuksessa

Loiset ja bakteerit kuuluvat vesiekosysteemeihin, eivätkä yleensä aiheuta luonnossa vakavia vaurioita isäntäänsä tai populaatiokokoon vaikuttavaa kuolleisuutta (Scholz 1999). Kalankasvatustiloksissa kuitenkin jotkin taudinaiheuttajat pystyvät lisääntymään nopeasti, tartuttamaan suuren osan kaloista ja aiheuttamaan mittavaa kuolleisuutta (Valtonen & Keränen 1981, Scholz 1999). Laitosympäristön ominaisuuksista johtuen on mahdollista, että kasvatustiloihin valikoituvat virulenteimmät taudinaiheuttajat, mikä selittää tautien erilaista dynamiikkaa luonnossa ja tiloksissa (Pulkkinen ym. 2010). Loistautien esiintyminen tiloksissa on ennustettavissa vuodenaajan (veden lämpötila), kalalajin, kalojen iän ja allastyypin perusteella (Rintamäki-Kinnunen & Valtonen 1997).

Laitosoloissa tarttuvien kalatautien vastustuksesta ja hoidosta syntyy kustannuksia (Picón-Camacho ym. 2012) ja taudeista aiheutuu tuotantotappioita niiden aiheuttaessa kuolleisuutta, alentunutta stressin sietoa sekä muutoksia kasvussa ja käytössä (Scholz 1999). Ympäristö, jossa tautien välttäminen maksimoidaan, ei välttämättä ole kustannustehokas: joitakin tauteja on taloudellisempaa pyrkiä hallitsemaan, kuin yrittää poistaa ne täysin laitosympäristöstä (Speare 1998). Esimerkiksi veden mukana laitokseen kulkeutuvilta taudinaiheuttajilta ei voi välttyä (Valtonen & Koskivaara 1994, Kunttu ym. 2012).

Eri taudit aiheuttavat kaloilla samantyyppisiä yleisoreita, mm. ruokahalun heikkenemistä ja värin tummumista (Rahkonen ym. 2012). Loistauteihin liittyy usein rauhaton uinti, lisääntynyt liman erityys (Khan 1991, Rintamäki-Kinnunen & Valtonen 1997) ja itsensä hankaaminen allasrakenteita vasten (Isaksen ym. 2010). Bakteeritaudeissa voi ilmetä apaattisuutta, äkkikuolemia ja verenvuotoja (Rahkonen ym. 2012). Sairausten oireiden tunnistaminen ja nopea, luotettava diagnostiikka on tärkeää, jotta hoito voidaan aloittaa tartunnan alkuvaiheessa vakavan taudinpurkauksen ehkäisemiseksi (Scholz 1999). Alkueläinloiset on helppo diagnosoida viljelylaitoksella valomikroskoopin avulla ja bakteeritauteja epäiltäessä tulee lähettää kalanäytteet patologiisiin ja mikrobiologiisiin tutkimuksiin (Rahkonen ym. 2012).

Kasvatusaikaisen menestyksen takaamiseksi tehokas tautivastustus on tiloksilla tärkeää. Tarttuvien tautien hoidossa toimivia lääkkeitä ja kemikaaleja on olemassa ja rutiininomaisesti käytössä, mutta niiden käytön esteenä on joissakin tapauksissa myrkyllisyys tai kehittyvä antibioottiresistenssi (Rintamäki-Kinnunen ym. 2005, Picón-Camacho ym. 2012, Declercq ym. 2013). Vaihtoehtoisia, ympäristö- ja käyttä-

jäystävällisiä kalatautien ehkäisy- ja hoitotapoja pyritään jatkuvasti kehittämään (Bodensteiner ym. 2000, von Gersdorff Jorgensen ym. 2012, Wohllebe ym. 2012).

2.3.2 *Trichodina*-tyyppi

Trichodina-tyypin ripsieläimet eivät ole kovin lajispesifisiä (Basson & Van As 2006) ja niitä esiintyy yleisesti makean ja meriveden kalojen iholla ja kiduksilla (Rahkonen ym. 2012). Suomessa *Trichodina*-ripsieläimiä on osoitettu esiintyvän kasvatuslaitoksessa lohella ja taimenella ympäri vuoden, ja suurimmat prevalenssit havaitaan talviaikaan (Valtonen & Koskivaara 1994, Rintamäki-Kinnunen & Valtonen 1997). *Trichodina*-alkueläimet leviävät helposti kalasta toiseen, sillä ne pystyvät uimaan vapaasti lyhyitä matkoja (Rahkonen ym. 2012). Loisen reservoaarina toimivat villit sekä viljellyt kalat, ja laitoksiin loiset päätyvät vesityksen mukana (Valtonen & Koskivaara 1994).

Trichodina-tyypin ripsieläimet ovat pääasiassa kommensaaleja, eikä niistä tavallisesti ole haittaa kalalle (Basson & Van As 2006). Tartunnat eivät yleensä vaadi hoitoa tai aiheuta kuolleisuutta kasvatuslaitoksissa (Rintamäki-Kinnunen & Valtonen 1997). Voimakkaita tartuntoja voi kuitenkin esiintyä, jos kalan pinnan ulkoisen suojan normaali toiminta häiriintyy esimerkiksi epäsuotuisien ympäristöolosuhteiden johdosta (Basson & Van As 2006). Voimakkaiden *Trichodina*-tartuntojen yhteydessä on joskus raportoitu kuolleisuutta sekundaari-infektioihin (Khan 1991).

Trichodina-ripsieläimet ovat mikroskooppisen pieniä (20 – 80 µm) ja ulkomuodoltaan päältä katsottuna pyöreitä, sivusta puolipallon muotoisia (Rahkonen ym. 2012). Loisen alapinnalla on rakenteeltaan monimutkainen kiinnittymislevy, jolla se tarttuu imukupin tapaan kalan ihoon ja kiduksille (Basson & Van As 2006). Loiset liikkuvat kalan pinnalla ripsiriviensä avulla ja syövät kalan pinnasta irtoavaa kuollutta solukkoa sekä ohi ajelehtivia hiukkasia ja bakteereita (Basson & Van As 2006).

Kiinnittymisestä voi aiheutua lievää ihoärsytystä kalalle (Basson & Van As 2006). Voimakkaissa tartunnoissa *Trichodina*-tyypin ripsieläimet voivat aiheuttaa vakavaakin vauriota kalan pintasolukolle: ne alkavat käyttäytyä ulkoloisten tapaan syömällä soluja ja ihovaurioihin ilmestyvää bakteerikasvustoa (Basson & Van As 2006). Ihon vakava vaurioituminen johtaa haavaumiin ja runsaaseen limaneritykseen (Khan 1991). Loisten esiintymistä suurina määrinä voidaan ehkäistä huolehtimalla kalojen hyvästä hoidosta, hygieniasta ja veden laadusta (Rahkonen ym. 2012). Muun muassa formaliniikylvetystä (Rahkonen ym. 2012) ja suolavesikylypyjä (Khan 1991) on käytetty voimakkaiden tartuntojen hoidossa ja hallinnassa.

2.3.3 *Apiosoma*-tyyppi

Apiosoma-tyypin alkueläimistä puhuttaessa tarkoitetaan useiden sukujen muodostamaa laajaa ryhmää samantyyppisiä ripsieläimiä, jotka elävät sessiileinä (paikallaan pysyen) isäntäkalojensa pinnalla (Basson & Van As 2006). Liikkuakseen ne muuttavat muotoaan sylinterimäisestä kiekkomaiseksi ja voivat näin uida isännästä toiseen (Basson & Van As 2006). Pääasiassa tartunta tapahtuu kalasta toiseen kosketuksen välityksellä (Rahkonen ym. 2012). *Apiosoma*-alkueläimiä esiintyy yleisesti useilla, pääasiassa makean veden kalalajeilla luonnonvesissä ja kasvatuslaitoksissa (Basson & Van As 2006). Suomalaisessa kalanviljelyssä tämän tyypin alkueläinten on todettu olevan yleisempiä taimenella kuin lohella (Valtonen & Koskivaara 1994, Rintamäki-Kinnunen & Valtonen 1997).

Apiosoma-tyypin ripsieläimet ovat 50 – 80 µm korkeita ja niiden yläosassa on kaulusmainen ripsirengas ja alaosassa jalkalevy, jolla ne kiinnittyvät kalan ihoon ja kiduksille (Rahkonen ym. 2012). Kala toimii *Apiosoma*-tyypin alkueläimille yleensä vain kiinnitysalustana, eikä tästä kommensaalista ole pieninä määrinä isännälleen haittaa (Basson & Van As 2006). Nämä ripsieläimet syövät kalan pinnalta irtoavaa kuollutta solukkoa sekä ympäröivässä vedessä olevia bakteereita ja pieneliöitä (Basson & Van As 2006). Voimakas tartunta saattaa aiheuttaa ihoärsytystä (Basson & Van As 2006), mikä lisää limaneritystä ja voi estää ihon ja kidusten normaalia toimintaa (Rahkonen ym. 2012).

Hyvä veden laatu, elinympäristön puhtaanapito ja muutoinkin kalojen kunnosta huolehtiminen ehkäisevät loisten massaesiintymistä (Rahkonen ym. 2012). Voimakkaan *Apiosoma*-tartunnan hoidossa voidaan tarvittaessa käyttää formaliinikylvelyksiä (Rahkonen ym. 2012), mutta kyseisen tyypin ripsieläimet ovat harvoin syypäänä kalan sairastumiseen (Basson & Van As 2006) eivätkä yleensä aiheuta kuolleisuutta (Rintamäki-Kinnunen & Valtonen 1997).

2.3.4 *Chilodonella* spp.

Chilodonella-suvun loisia esiintyy lähes kaikilla makean ja murtoveden kalalajeilla, ja ne aiheuttavat merkittäviä taudinpurkauksia erityisesti viljelyolosuhteissa (Basson & Van As 2006). Loisen aiheuttama tauti johtaa laajaan kidustuhoon (Rintamäki ym. 1994). Oletettavasti luonnossa vakavan infektion saaneet kalat kuolevat nopeasti eikä massiivisia taudinpurkauksia juuri esiinny (Valtonen & Koskivaara 1994); laitosoloissa

Chilodonella-tartunta aiheuttaa hoitamattomana vakavaa kuolleisuutta (Rintamäki-Kinnunen & Valtonen 1997).

Suomalaisten tutkimusten mukaan *Chilodonella*-tartunnat ovat meillä voimakkaimpia kesän kuumimpaan aikaan, ja tautia on tavattu istukaskasvatuksessa etenkin alle vuoden ikäisillä lohikaloilla (Rintamäki ym. 1994, Valtonen & Koskivaara 1994, Rintamäki-Kinnunen & Valtonen 1997). *Chilodonella* kuuluu ripsieläimiin ja suvussa on kaksi obliigaattia kalaparasitiittia, jotka voivat esiintyä isäntäkalassa samanaikaisesti: *Chilodonella piscicola* ja *Chilodonella hexasticha* (Basson & Van As 2006). Suomessa tavataan kumpaakin lajia, mutta yhtäaikaista infektiota ovat harvinaisia (Rintamäki ym. 1994).

Chilodonella-loiset ovat muodoltaan soikeita ja dorso-ventraalisesti litistyneitä (Basson & Van As 2006), niillä on ripsien ympäröimä solusuu, ja loisen alapinnalla on kaksi ripsirivien aluetta, joita ne käyttävät liikkumiseen (Rintamäki ym. 1994). Loinen kykenee lisääntymään viileässä ja lämpimässä vedessä ja selviää hengissä ilman isäntää koteloitumalla lepoasteeksi ja tarttumalla jälleen olosuhteiden muuttuessa suotuisiksi (Basson & Van As 2006). Loinen leviää pääasiassa kosketustartuntana (Rahkonen ym. 2012).

Loiset liikkuvat kalan iholla ja kiduksilla (Rintamäki ym. 1994) ja syövät solukkoa vaurioittaen kalan pintaa ja aiheuttaen lisääntynyttä limaneritystä sekä kidusten pintasolukon hyperplasiaa (Rahkonen ym. 2012). Vakava tauti johtaa yleensä hypoksiaan ja kalan kuolemaan kidusten hapenottopinta-alan vähentyessä voimakkaan turvotuksen ja tulehdusreaktion ansiosta (Rintamäki ym. 1994, Basson & Van As 2006). Pintasolukon vauriot altistavat kalan sekundaarisille bakteeri- ja sieni-infektioille (Rahkonen ym. 2012) ja estävät osmoottisen tasapainon säätelyä (Basson & Van As 2006). Sairaalla kalan oireita voivat olla ihon limaisuus, tummuus, läikikkyys ja haavaumat sekä silmien sameus, ilman haukkominen, epäsäännöllinen uinti ja nälkiintyminen (Basson & Van As 2006).

Chilodonella-tartunnasta voi aiheutua merkittäviä tuotantotappioita, joten hoitona käytettävät suolakylvytykset tulisi aloittaa heti, kun loisia havaitaan mikroskooppitutkimuksessa (Rahkonen ym. 2012). Loisen lisääntymistä tulee ehkäistä huolehtimalla kalojen kunnosta ja altaiden puhtaudesta (Rahkonen ym. 2012).

2.3.5 *Ichthyobodo necator*

Tämä pieni, 5 – 18 µm:n mittainen, vaihtelevasti pisaran tai soikion muotoinen siima-eläin (Tavolga & Nigrelli 1947) tunnetaan kalanviljelijöiden keskuudessa toisinaan edelleen entisellä nimellään *Costia (necatrix)*. Loinen on yleinen useilla makean veden kalalajeilla luonnossa ja kasvatuslaitoksissa (Rahkonen ym. 2012). Suomessa sitä on tavattu istukaskasvatuksessa erityisesti keväisin ns. starttivaiheessa, alle vuotiaiden kala-poikasten opetellessa syömään (Rintamäki-Kinnunen & Valtonen 1997), jolloin loinen voi hoitamattomana aiheuttaa suurta kuolleisuutta (Robertson 1979). Molekyylidiagnostiikan kehittyessä 2000-luvulla on pystytty tunnistamaan useita tautia aiheuttavia *Ichthyobodo*-lajeja, minkä myötä aiemmin tehty tutkimus loisen esiintymisestä ja tartuntojen dynamiikasta on asetettu kyseenalaiseksi (Isaksen ym. 2010).

Ichthyobodo-loisella on elämänkierrossaan vedessä vapaana elävä sekä kaloissa loisiva muoto: tartunta tapahtuu vapaana uivan muodon kiinnittyessä kalan pintasoluihin (Woo 2006). Loisvaiheessa *Ichthyobodo* elää kalan ihon, kidusten ja evien pinnalla syöden epiteelisoluja, limaa ja makrofageja (Tavolga & Nigrelli 1947). Vapaana elävällä muoto liikkuu siimojen avulla kalasta toiseen ja voi elää myös hajoavassa orgaanisessa materiaalissa isännän ulkopuolella (Tavolga & Nigrelli 1947). Viljelylaitoksiin loinen kulkeutuu todennäköisesti tuloveden mukana luonnonkaloista (Valtonen & Koskivaara 1994, Woo 2006, Isaksen ym. 2010). Loista on raportoitu esiintyvän myös mädin joukossa, jolloin poikaset saavat tartunnan kuoriutuessaan (Woo 2006).

Loinen voi lisääntyä laajalla lämpötila-alueella ja kykenee aiheuttamaan tautia myös viileän veden aikana (Robertson 1979). Loisen arvellaan olevan opportunisti, joka aiheuttaa tautia vain alttiissa populaatiossa tai altistavien tekijöiden läsnäollessa (Isaksen ym. 2010). Taudin oireiden vakavuus vähenee kalan ikääntyessä: pikkupoikaset ovat erittäin alttiita taudille, mutta yli vuoden ikäisillä kaloilla infektioita esiintyy vain huonokuntoisilla tai esim. lämpötilan laskemisen seurauksena (Robertson 1979). Epäillään, että tartunnasta kehittyy kalalle immuniteetti, mutta ympäristöolojen aiheuttama, vastustuskykyä heikentävä stressi voi kuitenkin altistaa uudelleensairastumiselle (Isaksen ym. 2010).

Lieviissä tartunnoissa kala oireilee pyörimällä ympäri ja hankaamalla itseään kasvatusaltaan rakenteisiin (Woo 2006, Isaksen ym. 2010). Loisten käyttäessä isännän pintasolukkoa ravintonaan kalalle aiheutuu ihovaurioita, mikä lisää liman eritystä ja aiheuttaa ihon paksuuntumista (Rahkonen ym. 2012). Voimakkaassa tartunnassa suomet irtoavat ja ihoon ilmestyy haavaumia (Isaksen ym. 2010), ihon pinnalle muodostuu

harmaa ketto ja kaloilla esiintyy myös yleisoireita, mm. heikkoutta ja anoreksiaa (Tavolga & Nigrelli 1947). Ihon vaurioituminen altistaa lisäksi sekundaari-infektioille (Tavolga & Nigrelli 1947) ja voi aiheuttaa erityisesti ensimmäisen kesän poikasille vakavia häiriöitä nestetasapainon säätelyssä (Robertson 1979). Loisten sijainnista riippuen taudissa voi esiintyä myös mittavia kidus- ja evävaurioita (Woo 2006). Infektion esiintyminen kiduksissa johtaa iho-infektiota useammin kuolleisuuteen (Tavolga & Nigrelli 1947).

Tautia voidaan ehkäistä pitämällä kalatiheydet pieninä, poistamalla kuolleet ja kuolemaisillaan olevat kalat päivittäin, puhdistamalla altaat usein (Rahkonen ym. 2012) ja pitämällä altaissa yllä riittävää veden virtausta (Isaksen ym. 2010). Formaliini-kylvetykset tulisi aloittaa heti, kun kalanpoikasten starttivaiheessa havaitaan yksittäisiä loisia mikroskoopilla (Rahkonen ym. 2012). Lievät infektiot vanhemmilla kaloilla paranevat yleensä itsestään (Robertson 1979, Isaksen ym. 2010).

2.3.6 *Ichthyophthirius multifiliis*

Ichthyophthirius multifiliis -ripsieläintä (jatkossa Ich, ei tule sekoittaa *Ichthyobodo*-loiseen) esiintyy maailmanlaajuisesti lähes kaikissa makean veden kalalajeissa, ja Suomessa se aiheuttaa säännöllisesti vakavia taudinpurkauksia istukasviljelyssä (Valtonen & Keränen 1981, Rintamäki-Kinnunen & Valtonen 1997). Tämä obligatorinen parasiitti on kalojen alkueläinloisista vaarallisimpia ja sen kalataloudelle vuosittain aiheuttamia tappioita pidetään merkittävänä (Dickerson 2006). Tartunnat voivat aiheuttaa jopa 50 – 80 %:n kuolleisuutta muutamassa päivässä ja ovat Suomessa ongelmana istukasviljelylaitoksilla kesän kuumimpana aikana erityisesti vuoden ikäisillä poikasilla (Valtonen & Keränen 1981, Valtonen & Koskivaara 1994, Rintamäki-Kinnunen & Valtonen 1997). Koska loinen selviää korkeintaan muutaman vuorokauden hengissä isännän ulkopuolella, sen oletetaan talvehtivan lievänä infektiona kalapopulaatiossa (Dickerson 2006). Loista esiintyy villeissä kaloissa ja yksittäisiä tautitapauksia on raportoitu myös luonnossa: laitokseen tulevan veden katsotaankin olevan tartuntojen lähteenä (Valtonen & Keränen 1981, Scholz 1999).

Ich:n elämänsykli on lämpötilariippuvainen: vapaana uiva parveilijavaihe ja kalassa loisiva vaihe vuorottelevat, ja mitä korkeampi lämpötila, sitä nopeammin loisen elämänsykli tapahtuu (Dickerson 2006). Aikuinen loinen irrottautuu kalan epidermiksestä elettyään siellä päivien tai viikkojen ajan, painuu pohjaan, koteloituu ja jakautuu kotelon sisällä sadoiksi ripselliseksi parveilijoiksi (Valtonen & Keränen 1981,

Dickerson 2006). Parveilijat tunkeutuvat kotelon läpi veteen ja etsivät uuden uuden isäntäkalan, jossa ne kaivautuvat ihon alle ja aloittavat jälleen kasvamisen (Dickerson 2006).

Kalan pintaliman komponentit vetävät puoleensa Ich:n parveilijamuotoa, minkä perusteella Ich tunnistaa potentiaalisen isännän osuessaan sellaisen läheisyyteen (Buchmann ym. 2001). Isännän kolonisaatiossa on tärkeässä osassa epiteeliin tunkeutumisen välittävä loisen pintarakenne, perforatorium (Dickerson 2006). Parveilijan on myös raportoitu suorittavan tietynlaista uintikoreagrafiaa isäntäkalaa lähestyessään (Bodensteiner ym. 2000).

Parveilijan tunkeutuminen ihoon ja kiduksiin aiheuttaa kudsvaurion, joka laajenee loisen kaivaessa käytäviä ja syödessä soluja kalan uloimman ihokerroksen alla (Dickerson 2006). Loisen liikkuminen aiheuttaa kalalle ihoärsytystä ja vakavissa infektioissa ihoon kehittyä kuolioivia haavaumia ja myös evät ja kidukset rappeutuvat. Loisen poistuessa kalasta ihoon jää reikä, joka on avoin infektioportti sekundaari-infektioille (Rahkonen ym. 2012).

Ich on helppo diagnosoida mikroskoopin avulla ja aikuiset loiset voidaan kokonsa puolesta (1,0 mm) havaita paljain silmin kalan pinnalla valkoisina pilkkuina (Rahkonen ym. 2012). Ich aiheuttaa valkopilkkutaudeksi kutsuttua sairautta, jossa epiteelin alla elävän loisen sekä kalan oman puolustusreaktion aiheuttamat vakavat iho- ja kidusvauriot voivat johtaa kalan kuolemaan hengityksen, erityksen ja osmoottisen tasapainon häiriintyessä (Dickerson 2006, Dickerson & Findly 2014). Kuolleisuudelle altistavat myös sairaudesta johtuva stressi ja mahdolliset sekundaari-infektiot (Dickerson 2006, Dickerson & Findly 2014). Alttiudessa Ich-infektioon on eroja kalalajien ja jopa saman lajin eri genotyyppien välillä; myös eri Ich-serotyypin virulenssi vaihtelee ja epidemiologiassa on eroja maantieteellisestä sijainnista ja ilmasto-oloista riippuen (Wei ym. 2013).

Ich-tartuntoja voidaan ehkäistä huolellisella altaiden puhdistuksella ja veden vaihtuvuudella (Scholz 1999), mutta Ich on hankalin torjuttava kalojen vaarallisista yksisoluisista loisista. Aiemmin taudin hoitona käytettiin tehokkaita malakiittivihreäkylvetyksiä, mutta Euroopan Neuvosto kielsi kyseisen aineen käytön vuonna 1998 eikä sitä ole saanut käyttää Suomessa vuoden 2001 jälkeen (Rintamäki-Kinnunen ym. 2005). Nykyään kylvetyksiin käytetään pääasiassa formaliinia, mutta uutta tehokasta kylvetyksainetta ei mittavasta tutkimuksesta huolimatta ole vakiintunut käyttöön (Rintamäki-Kinnunen ym. 2005, Picón-Camacho ym. 2012). Kylvetys tehoaa vain parveileviin yk-

silöihin, ei kaloissa ihon alla suojassa oleviin aikuistuviin tai altaan pohjalle koteloituneisiin loisiin (Dickerson 2006). Vaihtoehtoisia hoitomenetelmiä etsitään jatkuvasti.

Ich-tartunnasta selvinneille kaloille kehittyy pitkäaikainen immuniteetti loista vastaan (Valtonen & Keränen 1981, Buchmann ym. 2001, Dickerson & Findly 2014). Infektion aiheuttamaa immuunivastetta tutkimalla onkin edistetty rokotekehittelyä (Buchmann ym. 2001, von Gersdorff Jorgensen ym. 2012). Myös kasvatusaltaiden loismäärän vähentämistä fysikaalisin menetelmin on tutkittu (Bodensteiner ym. 2000, Picón-Camacho ym. 2012). Tehokasta, kestävää menetelmää loisen torjuntaan ei kuitenkaan ole toistaiseksi löydetty.

2.3.7 *Flavobacterium columnare*

Flavobacterium columnare on gram-negatiivinen sauvabakteeri, joka aiheuttaa kolumnaaritautia maailmanlaajuisesti makean veden vesiviljelyssä käytetyillä kalalajeilla (Declercq ym. 2013). Bakteeria esiintyy myös villeissä kalapopulaatioissa ja sitä on eristetty luonnonvesistä, joiden arvellaan toimivan kasvatuslaitosten taudinpurkausten tartuntalähteenä (Kunttu ym. 2012). Tauti aiheuttaa merkittävää kuolleisuutta ja tuotantotappioita kalankasvatuksessa (Suomalainen ym. 2005, Pulkkinen ym. 2010, Declercq ym. 2013). Suomessa taudin esiintyminen laitoksissa on lisääntynyt 1990-luvulta lähtien (Koski ym. 1993) ja taudinpurkauksia on kuvattu kesän lämpiminä kuukausina (Pulkkinen ym. 2010). Pulkkinen ym. (2010) osoittivat yli kahden vuosikymmenen aikana toteutetun seurannan perusteella *F. columnare* -bakteerin aiheuttamien taudinpurkausten yleistyneen ja niiden vakavuuden lisääntyneen suomalaisessa kalanviljelyssä.

Kolumnaaritautia esiintyy akuutissa ja kroonisessa muodossa: virulentit kannat aiheuttavat tyypillisesti äkillisesti ilmenevää, korkeaa kuolleisuutta, kun taas vähemmän virulentit kannat aiheuttavat pitkäaikaisen sairauden, jossa oireet kehittyvät hitaasti (Declercq ym. 2013). Bakteeri aiheuttaa ihoon, kiduksiin, eviin ja suun limakalvoille haavaumia ja syöpymiä, joita tyypillisesti peittää vaaleankellertävä limakerros (Declercq ym. 2013). Vaikka patologisia muutoksia havaitaan tyypillisesti vain kalan pinnalla, bakteeri leviää myös sisäelimiin ja kuolemaan voivat johtaa mm. laajamittainen kudostuho, kidusten toiminnan häiriintyminen sekä anoreksiasta johtuva nälkiintyminen (Declercq ym. 2013). Ulkoisen puolustusjärjestelmän rikkoutuessa kala altistuu sekundaari-infektioille (Declercq ym. 2013). Kalanviljelyssä tautia hoidetaan rehun mukana annosteltavin antibiootein sekä kemikaalikylvetyksin (Pulkkinen ym. 2010, Declercq ym. 2013).

F. columnare tarttuu kalasta toiseen suoran kontaktin tai veden välityksellä, ja tartunnan saaneet, taudista parantuneet kalat jäävät bakteerin kantajiksi (Pulkkinen ym. 2010). Taudin leviäminen tehostuu suurissa kalatiheyksissä, ja tautikuolleisuus kasvaa lämpötilan noustessa (Suomalainen ym. 2005). Bakteerin on osoitettu säilyvän vesiympäristössä pitkiä aikoja ja leviävän helpommin kuolleiden kuin elävien kalojen välityksellä (Pulkkinen ym. 2010). Vedessä oleva orgaaninen kiintoaine edistää tämän hajoavaa eloperäistä materiaalia syövän, saprofyyttisen, bakteerin säilymistä ympäristössä (Declercq ym. 2013).

Kolumnaaritaudin patogeneesi ei ole mittavasta tutkimuksesta huolimatta täysin selvillä: esimerkiksi kolonisaation tarkkoja mekanismeja ei tunneta hyvin (Declercq ym. 2013). On esitetty, että kalalajista riippuen kalan ihon limakerros joko inhiboi tai edistää bakteerin kasvua, ja että *F. columnare* -kannan virulenssiin vaikuttavat kudostuhoa aiheuttavat ekso- ja endotoksiinit sekä bakteriosiinit (Declercq ym. 2013). Useiden laitosympäristössä vaikuttavien tekijöiden ja kasvatusmenetelmien on ajateltu aiheuttavan *F. columnare* -bakteerin virulenttien kantojen valikoitumista kalanviljelylaitoksiin (Pulkkinen ym. 2010).

2.4 Tarttuvien tautien esiintymiseen ja tautikuolleisuuteen vaikuttavat tekijät

Muutokset ympäristöolosuhteissa ja isännän fysiologisessa tilassa vaikuttavat taudinaiheuttajien esiintymiseen kalapopulaatioissa: kalan sairastumiseen vaikuttavat kalan vastustuskyky, ympäristön tila sekä patogeenin taudinaiheutuskyky ja tartuntapaine (Rahkonen ym. 2012). Infektio tauti puhkeaa, kun altis isäntä kohtaa virulentin patogeenin sopivissa ympäristöolosuhteissa (Kunttu 2010). Vesiviljelyn keinotekoiset olosuhteet ja stressitekijät heikentävät kalojen vastustuskykyä (Reddy & Leatherland 1998) ja muuttavat olennaisesti patogeenien leviämisen ekologiaa ja epidemiologiaa (Pulkkinen ym. 2010).

Tautidynamiikka on kalapopulaatiossa vahvasti olosuhderiippuvaista, mutta tutkimustietoa kasvatusolosuhteiden ja ympäristötekijöiden muuntelun vaikutuksista tartuntatautien esiintyvyyteen kalankasvatuslaitoksissa on olemassa vain vähän – etenkin vaikutusten taustalla olevat mekanismit ovat usein vielä arvelujen varassa. Tässä kirjallisuuskatsauksen viimeisessä osiossa tarkastellaan edellisissä kappaleissa esitetyn tiedon ja aiheesta tehdyn aiemman tutkimuksen valossa tarttuvien lois- ja bakteeritautien esiintymiseen vaikuttavia tekijöitä istukasviljelyssä kasvatusaikana. Erityisesti painotetaan olosuhteita, joita ihminen voi kasvatusympäristössä muokata.

2.4.1 Kasvatusolosuhteiden vaikutus tartuntapaineeseen

Voidakseen aiheuttaa tautia on patogeenin ensin päästävä laitokseen, missä sen on saatava kontakti potentiaaliseen isäntäkalaan. Absoluuttiseen tartuntapaineeseen vaikuttavat taudinaiheuttajan ja alttiin isännän määrä altaissa sekä aika, jonka patogeeni pääsee olemaan kosketuksissa potentiaalisen isännän kanssa. Kun nämä tekijät ovat optimaalisia taudinaiheuttajan kannalta, tartunnan tapahtuminen ja taudin puhkeaminen riippuu patogeeni-isäntä -vuorovaikutuksesta vallitsevissa olosuhteissa. Näin tartuntapaine ja taudinaiheutuskyky ovat riippuvaisia toisistaan.

Mikäli laitoshygienia on kunnossa eikä saapuvan mädin, kalojen tai vierailijoiden mukana pääse leviämään tauteja (Rahkonen ym. 2012), istukaslaitokseen pääsee taudinaiheuttajia vain tuloveden mukana (Valtonen & Koskivaara 1994). Veden ottopaikasta riippuu, kuinka paljon ja mitä taudinaiheuttajia veden mukana laitokseen tulee. Taudinaiheuttajan läsnäolo altaassa puolestaan riippuu veden lähteestä, veden lämpötilasta, altaan hygieniasta ja veden vaihtuvuudesta altaassa.

Kullekin taudinaiheuttajalle, samoin kuin kalalajille, on olemassa optimaaliset elinolosuhteet. Veden laatu (mm. pH, liuenneet ja kiinteät aineet, lämpötila) vaikuttaa etenkin vapaana liikkuvassa vaiheessa olevan patogeenin elinkykyyn: esimerkiksi Ich:n parveilijamuoto tarvitsee vesiympäristöstään kalsiumia (Wei ym. 2013). Veden lämpötilan noustessa taudinaiheuttajien lisääntyminen kiihtyy (Valtonen & Keränen 1981, Rintamäki ym. 1994, Rintamäki-Kinnunen & Valtonen 1997, Suomalainen ym. 2005), minkä ansiosta niiden määrä altaassa, ja sen myötä tartuntapaine, kasvaa.

Altaassa ollessaan taudinaiheuttajan on päästävä kosketuksiin kalan kanssa. Suurissa kalatiheyksissä on todennäköisempää kohdata infektiolle altis isäntä kuin harvoissa populaatioissa (Pulkkinen ym. 2010). Suomalainen ym. (2005) totesivat kirjo-lohella tehdyssä tutkimuksessa *F. columnare* -bakteerin leviämisen olevan nopeampaa kasvatuksessa normaalisti käytettävissä kalatiheyksissä (100 kalaa/15 litran akvaario) kuin harvemmissä tiheyksissä (25 kalaa/15 l). Tilastollisesti merkitsevää eroa taudin aiheuttamassa kuolleisuudessa ei tässä tutkimuksessa havaittu, mutta kuolleisuus kesti pidempään korkeammissa kalatiheyksissä. Koska moni patogeeni kykenee liikkumaan vain lyhyitä etäisyyksiä vapaana vedessä, suuret määrät samanikäisiä kaloja rajatuissa tiloissa tarjoavat otolliset olosuhteet tautien leviämiselle (Valtonen & Koskivaara 1994, Suomalainen ym. 2005).

Korkeissa kasvatustiheyksissä altaiisiin kerääntyy helposti orgaanista materiaalia, kuten ulosteita ja ylijäänyttä ruokaa, mikä suosii saprofyyttisten patogeenien säi-

lymistä altaassa (Tavolga & Nigrelli 1947, Declercq ym. 2013). Näin ollen suurissa kalatiheyksissä altaiden puhtaanapidon merkitys korostuu. Kaloille aiheutuu myös sosiaalista stressiä jatkuvista kontakteista toisiin kaloihin, mikä voi heikentää niiden vastustuskykyä ja näin tehdä populaation alttiimmaksi sairastumiselle (Keenleyside & Yamamoto 1962, Reddy & Leatherland 1998).

Tarttuvia tauteja voidaan ehkäistä huolehtimalla asiallisesta laitoshygieniasta ja kalojen hyvästä hoidosta huomioiden tässä katsauksessa aiemmin esitetyt tekijät. Jos altaisiin lisätään esimerkiksi ympäristön virikkeellistämiseksi materiaalia, joka on hankalasti puhtaanapidettävää, voivat kasvatusaikaiset tartuntataudit ja kuolleisuus lisääntyä hygienian heikkenemisen myötä (Hirvonen, henkilökohtainen tiedonanto).

2.4.1.1 Veden virtauksen ja vaihtuvuuden vaikutus tartuntapaineeseen

On esitetty, että muuttamalla veden virtausta altaissa voidaan vähentää merkittävästi kuolleisuutta loistauteihin (Johansson & Svensson 1977, Bodensteiner ym. 2000). Johansson ja Svensson (1977) totesivat lohenkasvatuksessa korkeamman virtausnopeuden (0,3 – 0,6 m/s, verrattuna kontrollien 0,1 - 0,3 m/s) vähentävän *Trichodina*-loisten aiheuttamaa kuolleisuutta lähes puoleen kontrolliryhmän kuolleisuuteen verrattuna. Tutkimus tehtiin lohen normaaleissa kasvatustiheyksissä ja -olosuhteissa, ja tutkijoiden mukaan kuolleisuus oli koko taudinpurkauksen ajan korkeampaa ja kesti pidempään matalamman virtauksen altaissa (Johansson & Svensson 1977). Nopean virtauksen arveltiin huuhtoneen pois infektiivistä materiaalia ja/tai parantaneen kalojen fyysistä kuntoa, jolloin niillä olisi ollut paremmat valmiudet käsitellä loiskuorman aiheuttamaa stressiä (Johansson & Svensson 1977). Tutkimuksen aineisto ja menetelmät on kuitenkin kuvattu puutteellisesti, joten tehtyjen johtopäätösten syy-seuraussuhteet jäävät epävarmoiksi.

Bodensteiner ym. (2000) tutkivat veden virtauksen vaikutusta tietoisesti aiheutetun ja luonnollisesti ilmenneen Ich-infektion aiheuttamaan kuolleisuuteen pilkkupiikkimonneilla laboratorio- ja kasvatusolosuhteissa. Veden virtausta ja altaiden veden vaihtuvuutta lisäämällä (kokeessa altaiden veden vaihtuvuus 0,5 – 4,5 kertaa tunnissa) Ich-kuolleisuus putosi lähes sadasta prosentista 7 – 14 prosenttiin (Bodensteiner ym. 2000). Havaitut erot eivät riippuneet kalatiheydestä. Suurissa ulkoaltaissa Ich-infestaatio saatiin kuriin säätämällä veden pinnan korkeutta ja näin pitämällä veden virtaus ja vaihtuvuus nopeana (vaihtuvuus vähintään 2,1 krt/h) (Bodensteiner ym. 2000). Johtuiko loistartunnan väheneminen veden virtauksen kiihtymisestä vai veden vaihtuvuuden kasvusta, jäi kokeessa epäselväksi. On mahdollista, että Ich-loiselle ominainen

kolonisaatiouintikäyttäytyminen estyi nopean virtauksen johdosta tai suuri veden vaihtuvuus huuhtoi loiset pois altaasta, jolloin tartuntapaine pieneni (Bodensteiner ym. 2000).

Toisessa pilkkupiikkimonneilla tehdyssä tutkimuksessa ei koeolosuhteissa havaittu eroa Ich-infestaatioissa staattisen vesiympäristön ja 1 krt/h veden vaihtuvuuden välillä (Tieman & Goodwin 2001). Tässä koejärjestelyssä veden virtaus oli mahdollisesti liian alhainen vaikuttaakseen Ich-tartuntoihin. Toistaiseksi Bodensteiner ym. (2000) ovat ainoita, jotka ovat raportoineet veden virtauksesta onnistuneena keinona Ich:n kontrollointiin (Picón-Camacho ym. 2012). Isaksen ym. (2010) arvelivat, että hitaampi veden virtaus lohien verkkoallaskasvatuksessa maa-altaisiin verrattuna olisi voinut vähentää *Ichthyobodo*-loisen poistumaa altaista ja pidentää kalojen altistusaikaa loiselle, mikä olisi vaikuttanut verkkoaltaissa havaittuihin suurempiin loisprevalensseihin.

Veden nopean virtauksen ja vaihtuvuuden ajatellaan siis poistavan infektiivistä ja muuta orgaanista materiaalia altaasta, ja mahdollisesti vaikeuttavan patogeenin pääsyä isäntäkalaan. Lisäksi nopea virtaus edesauttaa veteen liunneen hapen määrän pysymistä korkeana (Bodensteiner ym. 2000), kasvattaa kalan fyysistä kuntoa (Anttila ym. 2006) ja vaikuttaa ravinnon jakautumiseen (Rodewald ym. 2011). Nämä tekijät puolestaan voivat vaikuttaa kalan fysiologiaan ja vastustuskykyyn, ja sitä kautta patogeeni-isäntä -vuorovaikutukseen.

2.4.2 Kasvatusolosuhteiden vaikutus patogeenin taudinaiheutuskykyyn

Ympäristötekijät voivat vaikuttaa suoraan patogeenin ominaisuuksiin ja taudinaiheutusmekanismeihin tai ne voivat aiheuttaa muutoksia kalan fysiologiassa ja vastustuskyvyssä. Taudin esiintyminen ja leviämismahdollisuudet vaihtelevat ympäristön mukaan ja taudinaiheutuskyky on riippuvainen olosuhdetekijöistä, jotka muokkaavat patogeenin ja sen isännän välistä vuorovaikutusta. Ympäristön vaikutuksia tutkittaessa on syytä ottaa huomioon myös perimän aiheuttama muuntelu eliön ilmiasussa.

Kuten jo edellä todettiin, PCR-teknologian kehittymisen myötä joidenkin kalapatogeenien tarkka, genomitasoinen lajinmääritys on nykyään mahdollista (Isaksen ym. 2010, Coyne ym. 2011) ja aikaisempi lajikäsitys on asetettu kyseenalaiseksi muun muassa *Ichthyobodo*-loisen osalta. Eri *Ichthyobodo*-genotyyppien tiedetään aiheuttavan tautia erilaisissa vesiolosuhteissa (makea vs. merivesi) (Isaksen ym. 2010). Maailmanlaajuisesti esiintyvän Ich-loisen vuodenaikaisvaihtelussa taasen tunnetaan maantieteelliseen sijaintiin, tarkemmin ilmastovyöhykkeeseen, liittyviä eroja (Rintamäki-Kinnunen

& Valtonen 1997), ja tiettyjen Ich-serotyyppeiden on raportoitu olevan toisia virulentimpia (Wei ym. 2013).

Tunnettujen taudinaiheuttajien tiettyjen genotyyppien erityisominaisuuksista ei ole vielä paljon tutkimustietoa (Isaksen ym. 2010). On mahdollista, että tulevaisuudessa laajalle levinneiden, generalisteina pidettyjen patogeenien todetaan olevan ryhmä saman lajin eri variantteja, tai jopa eri lajeja, joiden taudinaiheutuskyky poikkeaa hieman toisistaan. Tutkittaessa virulenssia, patogeneesiä, ekologiaa ja epidemiologiaa, on tärkeää tietää tarkalleen, mistä patogeenista puhutaan. Johtopäätöksiä ympäristön vaikutuksesta taudinaiheutuskykyyn voidaankin tehdä vasta, kun tietyn patogeenin edellä mainitut ominaisuudet tunnetaan riittävän hyvin.

Luonnonkaloilla esiintyy harvoin suurta kuolleisuutta aiheuttavia taudinpurkauksia (Scholz 1999). Syynä voi olla muun muassa sairaiden yksilöiden nopea joutuminen saalistuksen kohteeksi (Kunttu 2010), mutta taustalla saattaa vaikuttaa myös luonnonpopulaatioiden parempi sopeutuminen ympäristössä esiintyviin taudinaiheuttajiin ja näin suurempi vastustuskyky tauteja vastaan. Eri kalalajien ja -yksilöiden välillä tunnetaan eroja alttiudessa tietyille patogeeneille (Valtonen & Koskivaara 1994, Rintamäki-Kinnunen & Valtonen 1997, Isaksen ym. 2010). Lohen luonnon- ja laitospopulaatioiden on todettu eriytyneen geneettisesti toisistaan (Gross 1998), joten on mahdollista, että villien ja kasvatettujen lohien välillä on eroa alttiudessa tarttuville taudeille.

Villi- ja laitospopulaatioiden välisten erojen tutkiminen on keskittynyt pääasiassa istukasmenestykseen vaikuttaviin tekijöihin ja kalojen ”geneettisen laitostumisen” on esitetty alentavan voimakkaasti menestystä luonnossa (Araki ym. 2007). McDonald ym. (1998) totesivat muun muassa, että luonnosta otetuilla lohenpoikasilla oli laitoslohen poikasiin verrattuna parempikuntoiset evät, ja villilohet olivat kestävämpiä uimareita ja kooltaan suurempia kuin laitospoikaset. Näihin ominaisuuksiin tosin arveltiin vaikuttaneen monien ympäristötekijöiden, jotka luonnossa ja laitoksissa poikkeavat toisistaan (McDonald ym. 1998). Rodewald (2013) havaitsi lieviä eroja luonnon- ja laitoskantojen välillä istukasmenestystä mittaavia ominaisuuksia tutkiessaan, mutta totesi ympäristötekijöiden olleen emotaustaa huomattavasti merkittävämpiä erojen aiheuttajia.

Selvitettäessä kalan geneettisen taustan vaikutusta kasvatusaikaiseen menestykseen, sairastuvuuteen ja kuolleisuuteen on huomioitava, että laitospopulaatiot ovat sopeutuneet nimenomaan laitosolosuhteisiin, joissa luonnossa edulliset sopeumat saattavat osoittautua epäedullisiksi. Lisäksi ympäristöolosuhteet muokkaavat kalan il-

miasua voimakkaasti, joten perimän ja ympäristön aiheuttamia eroja on haasteellista tutkia erikseen (Rodewald 2013).

2.4.2.1 Vastustuskyky vs. taudinaiheutuskyky

Isännän puolustusjärjestelmän ja patogeenin taudinaiheutusmekanismien välillä käydään jatkuvaa vuorovaikutusta. Lämpimässä vedessä kalan puolustusjärjestelmän toiminta kiihtyy, mutta niin kiihtyy taudinaiheuttajien lisääntyminenkin (Rahkonen ym. 2012). Useiden patogeenien taudinaiheutuskyvyn on osoitettu olevan lämpötilariippuvaista: esimerkiksi Ich-loisen ja *F. columnare* -bakteerin virulenssi kasvaa veden lämpötilan kohotessa (Dickerson 2006, Pulkkinen ym. 2010). Liian korkea lämpötila altistaa kaloja stressin myötä vastustuskyvyn alenemiselle, mutta toisaalta lämpimässä kalan immuunivaste on nopeampi ja voimakkaampi kuin viileässä, mikä voi tehostaa patogeenin eliminoimista. Kalan vastustuskykyyn vaikuttavat myös aiemmin tässä katsauksessa esitellyt muut olosuhdetekijät.

On huomion arvoista, että voimakas immuunivaste itsessään saattaa pahentaa taudin oireita ja näin näennäisesti lisätä patogeenin virulenssia (Dickerson & Findly 2014). Vasta-ainevälitteinen, hankittu immuniteetti on tärkeässä osassa Ich-loisen aiheuttaman valkopilkkutaudin torjumisessa. On kuitenkin esitetty olettamus, että kalan iholla ja limakalvoilla Ich-infestaation alussa muodostuva synnynnäinen, soluvälitteinen immuunivaste vain voimistaa taudissa esiintyviä epiteelivaurioita ilman, että loiselle aiheutuu haittaa tästä kalan puolustusjärjestelmän aktivaatiosta (Dickerson & Findly 2014). Näin ollen kalayksilöt, joilla Ich-tartunnasta aiheutuu voimakas synnynnäisen immuunipuolustuksen aktivaatio, voisivat olla alttiimpia vakavalle sairastumiselle kuin yksilöt, joilla hankittu immuunivaste dominoi.

Patogeenin taudinaiheutuskyky on riippuvainen ympäristötekijöistä. Vesiviljelylaitoksen olosuhteet asettavat taudinaiheuttajien evoluutiolle erilaiset valintapaineet kuin luonnossa, ja laitosympäristöön arvellaan valikoituvan virulenteimpia patogeenikantoja (Pulkkinen ym. 2010). Virulenssi kasvaa esimerkiksi, kun isännän kuolemasta ei ole haittaa patogeenin lisääntymiskyvylle: näin on osoitettu käyneen saprofyytisen *F. columnare* -bakteerin tapauksessa, jossa taudinaiheuttaja leviää laitosoloissa paremmin kuolleiden kuin elävien kalojen välityksellä (Pulkkinen ym. 2010). Kun korkeammasta virulenssista näin aiheutuu kilpailuetua tietyissä olosuhteissa, voidaan taudinpurkausten olettaa tällöin olevan vakavampia ja aiheuttavan enemmän kuolleisuutta kuin ympäristössä, jossa vähemmän virulentit patogeenit menestyvät.

On varsin yleistä, että viljelyolosuhteissa kaloilla esiintyy useaa ulkoloista samanaikaisesti, joskin tyypillisesti vain yksi näistä on voimakkaasti patogeeninen laji (Valtonen & Koskivaara 1994, Rintamäki-Kinnunen & Valtonen 1997). Myös lois- ja bakteeritartuntoja esiintyy yhtäaikaaisesti, ja loisinfestaatio altistaakin kaloja sekundaarisille bakteeri-infektioille (Khan 1991). Toisaalta on todettu, että isännän immuunipuolustuksen epäspesifi aktivoituminen jonkin tekijän (esim. toisen patogeenin) johdosta suojaa hieman myös Ich-loisen aiheuttamalta taudilta (Buchmann ym. 2001). Tällaista epäspesifistä immunostimulaatiota on raportoitu syntyvän myös reaktiona rokotteiden adjuvantteihin, ja sen on epäilty osaltaan vaikuttaneen *Ichthyobodo necator sensu stricto* -infestaation häviämiseen lohenpoikasista bakteeritauteja vastaan annetun rokotteen seurauksena (Isaksen ym. 2010). Mikä tahansa ympäristötekijä, joka aiheuttaa kalan immuunipuolustuksen aktivoitumista, saattaa siis jonkin verran suojata kalaa tarttuvilta taudeilta.

Vesiviljely-ympäristön erilaiset stressitekijät aiheuttavat kaloille immunosuppressiota ja altistavat infektioille (Reddy & Leatherland 1998). Pickering ja Pottinger (1989) osoittivat jatkuvien stressitekijöiden – tilan rajoittamisen, suuren kalatiheyden ja toistuvien verinäytteenottojen – aiheuttavan kirjolohella ja taimenella plasman kortisolipitoisuuden kohoamista viikkojen ajaksi. Kuukausia kestänyt plasman kortisolitasen nousu puolestaan aiheutti näillä lohikaloilla tautikuolleisuutta bakteeri- ja sieni-infektioihin (Pickering & Pottinger 1989).

Olosuhteiden vaihtelu itsessään aiheuttaa stressiä (Teixeira ym. 2007), mutta toisaalta esimerkiksi muutokset veden virtauksessa vaikuttavat kalan kuntoon (Anttila ym. 2006) ja ravinnon jakautumiseen altaassa (Rodewald ym. 2011). On esitetty, että ruokintaa muuttamalla voitaisiin mahdollistaa luonnonmukainen reviirikäyttäytyminen kasvatettavilla lohilla, minkä ansiosta lohien kokema sosiaalinen stressi vähenisi (Keenleyside & Yamamoto 1962, McDonald ym. 1998, Reddy & Leatherland 1998). Se, mitkä olosuhteet ovat stressaavia ja vaikuttaako koettu stressi kalaan positiivisesti vai negatiivisesti, ei siis ole kovin yksiselitteistä. Myös kalan kunnon ja vastustuskyvyn suhde on monimutkainen, koska pääosin muutokset yleiskunnossa (ravitsemustila, stressinsieto, sairaudet, fysiologinen tila jne.) vaikuttavat myös vastustuskykyyn.

Isaksen ym. (2010) totesivat *Ichthyobodo necator sensu stricto* -infestaation olevan voimakkaampi pienillä kuin suurikokoisilla lohenpoikasilla; lisäksi naiivissa populaatioissa pienikokoisilla poikasilla kidusinfestaatiot olivat yleisempiä ja

vastaavasti suurikokoisilla poikasilla loista esiintyi tyypillisesti iholla. Tartunnan uusittua myöhemmin yhteyttä infestaation sijainnin ja kalojen koon kanssa ei havaittu, minkä arveltiin johtuvan joko epidermiksen muutoksista tai immunitetin kehittymisestä (Isaksen ym. 2010). Robertson (1979) taas ei todennut kalan kunnon ja loisinnan intensiteetin välillä eroja lohikalojen *Ichthyobodo*-infestaatioissa. Kidustartunnat ovat taudinaiheuttajasta riippumatta tyypillisesti haitallisempia isäntäkalalle kuin ihotartunnat hapenottokyvyn heikentymisestä johtuen (Valtonen & Keränen 1981, Rintamäki ym. 1994), joten jos tietyt kalan kuntoon vaikuttavat olosuhteet suosivat loistartuntoja kuduksilla, on mahdollista, että näissä olosuhteissa vakavia infektiota ja kuolleisuutta esiintyy enemmän.

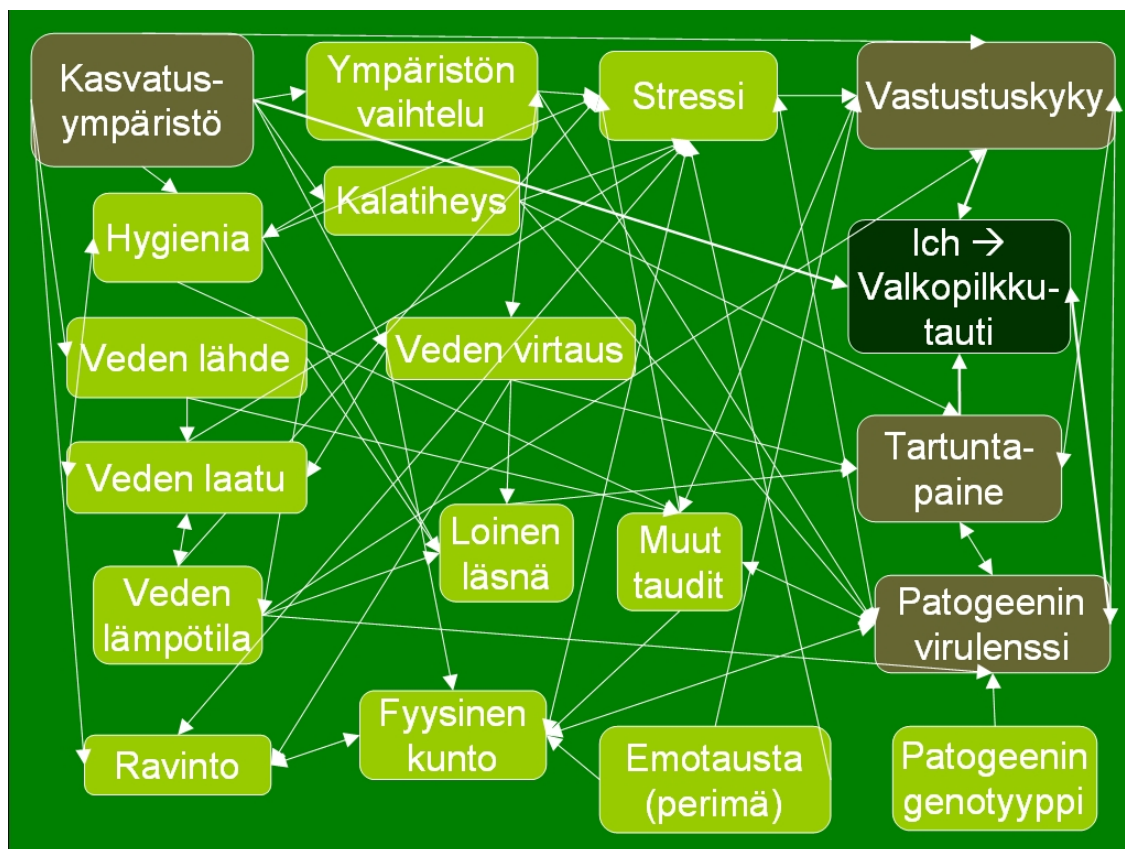
Kalan iho ja limakalvot toimivat mekaanisena suojana mikrobeja vastaan ja vaurioituessaan tarjoavat tartuntareitin elimistöön (Rahkonen ym. 2012). Ihon rikkoutuminen on yleistä viljelyolosuhteissa (Kunttu 2010), missä korkea kalatiheys ja kosketus allasrakenteisiin oletettavasti altistavat kalaa pintavaurioille. Alustavissa tutkimuksissa on kuitenkin havaittu kasvatusympäristön virikkeellistämisen altaisiin rakennetuin suojapaikoin sekä veden virtausta ja ruokintaa muuntelemalla vähentävän eväaurioita, kasvatusaikaista kuolleisuutta ja loisinfestaatiota taimenen normaaleissa kasvatustiheyksissä (Hyvärinen, henkilökohtainen tiedonanto). Allasrakenteet ja kalatiheys eivät siis välttämättä kaikissa olosuhteissa lisää kalan pinnan vaurioitumisen todennäköisyyttä. Mielenkiintoista onkin selvittää, voidaanko kasvatusympäristön vaihtelevuutta, ts. luonnonmukaisuutta, lisäämällä todella vähentää kasvatusaikaista loiskuormaa ja tautikuolleisuutta.

2.5 Yhteenveto tarttuvien kalatautien esiintyvyyteen vaikuttavista tekijöistä

Kirjallisuuskatsauksen tavoitteena oli selvittää, miten kasvatusympäristö ja kalakantojen laitostuminen vaikuttavat istukaskasvatuksessa merkittävimpien tautien esiintymiseen ja kasvatusaikaiseen kuolleisuuteen. Tarkoitus oli antaa näkökulmia, joiden avulla voidaan jatkossa tutkia vaihtelevan kasvatusympäristön roolia kasvatusaikaisten loistartuntojen ja kuolleisuuden vähentämisessä. Katsauksessa vertailtiin luonnon- ja laitosympäristön eroja sekä pohdittiin eri ympäristötekijöiden vaikutusta kalaan ja tarttuviin tauteihin. Saatu ymmärrys tarttuville taudeille otollisista olosuhteista auttaa suunnittelemaan niiden ehkäisyyn tähtäävää jatkotutkimusta.

Katsauksessa käsitellyn tutkimusnäytön perusteella voidaan todeta, että kasvatusympäristö ja sen aiheuttama geneettinen valintapaine muokkaavat monia kalan

ja taudinaiheuttajan ominaisuuksia, mm. vastustuskykyä ja virulenssia. Nämä puolestaan määrittävät, millainen isäntä-patogeeni -vuorovaikutuksesta muodostuu. Kuvassa 1 havainnollistetaan yksinkertaistaen Ich:n leviämiseen ja valkopilkkutaudin esiintymiseen vaikuttavia tekijöitä sekä niiden monimutkaisia keskinäisiä vuorovaikutussuhteita. Samat pääperiaatteet pätevät myös muihin tässä katsauksessa esiteltyihin taudinaiheuttajiin. Jokaisen patogeenin kohdalla on kuitenkin otettava huomioon sille ominaiset taudinaiheutusmekanismit ynnä muut juuri kyseisen organismin ekologiaan ja epidemiologiaan vaikuttavat erityistekijät.



Kuva 1. Valkopilkkutaudin puhkeamiseen vaikuttavien tekijöiden keskinäiset riippuvuussuhteet. © Mariella Aalto-Araneda

3 AINEISTO JA MENETELMÄT

Lisensiaatin tutkielman kokeellisessa osiossa tutkittiin ulkoloisten esiintymistä ja tarttuvien tautien aiheuttamaa kuolleisuutta lohen istukaskasvatuksen aikana. Näytteenotto loisprevalenssien selvittämiseksi tehtiin RKTL:n Kainuun kalantutkimusasemalla Pal-

tamossa kesä-elokuussa 2010. Tutkielmaa varten otettiin iholimanäytteitä istukkaiksi kasvatettavista vuoden ikäisistä Itämeren lohista. Näytteenotto ja kalojen käsittely toteutettiin Etelä-Suomen lääninhallituksen eläinkoelautakunnan myöntämän eläinkoeluvan (ESLH-2008-04178/Ym-23) mukaisesti. Iholimanäytteistä tutkittiin mikroskoopin avulla niissä esiintyvien ulkoloisten tyyppi ja määrä. Tutkimusaseman kirjanpidosta saatiin päiväkohtaiset tiedot altaissa esiintyneestä kuolleisuudesta. Eroja kuolleisuudessa tarkasteltiin allaskohtaisten kuolleisuuskuvaajien avulla, ja loisprevalenssit tutkittiin tilastollisin menetelmin.

Ympäristön ja emotaustan vaikutusten tarkastelemiseksi tutkimussaltaat oli jaettu neljään eri käsittelyyn niin, että kutakin käsittelytyyppiä oli neljä allasta: villiemojen poikaset virikealtaissa (VV), villiemojen poikaset standardialtaissa (VS), laitosemojen poikaset virikealtaissa (LV) ja laitosemojen poikaset standardialtaissa (LS). Standardialtaiden kalat olivat kasvaneet koko ikänsä istukaskasvatuksessa yleisesti käytössä olevalla menetelmällä, Det Norske Veritas Quality system -sertifikaatin nro 2000-HEL-AQ-833, SFS-EN ISO 9001 mukaisesti. Virikealtaiden kalat puolestaan kasvatettiin kuoriutumisestaan asti kalantutkimusasemalla kehitetyllä vaihtelevan kasvatusympäristön menetelmällä, jossa käytettiin soveltuvin osin sertifikaatin mukaisia menettelytapoja. Tutkimusaseman kirjanpidosta kävi ilmi virikealtaissa tehdyt olosuhteiden muutokset sekä altaiden ruokinta ja muut hoitotoimenpiteet.

3.1 Tutkimuspopulaatio ja otoskoko

Tutkimuksessa käytetyt lohenpoikaset olivat kuoriutuneet keväällä 2009 Kainuun kalantutkimusasemalla haudotusta Tornionjoen merilohen mädistä. Laitosemojen poikasten mätä oli peräisin RKTL:n Taivalkosken laitoksella kasvatetuista emokaloista ja villiemojen poikasten mätä oli kerätty luonnossa lisääntyvistä Tornionjoen lohista. Hedelmöitetty mätä, josta tutkimuspopulaation poikaset haudottiin, oli koostettu seuraavasti: Laitosemoja oli 68 koirasta (1. laitossukupolvi) ja 68 naarasta (2. laitossukupolvi), ja hedelmöityksissä käytettiin kahdesta kolmeen koirasta yhdelle naaraalle. Villejä emoja oli pyydystetty Tornionjoesta 27 naarasta ja 12 koirasta; hedelmöityksissä yhtä koirasta käytettiin neljästä viiteen naaraalle, ja samalle naaraalle käytettiin aina kahta koirasta. Tutkimuspopulaation kasvatustapa ensimmäisen vuoden aikana (ennen tämän lisensiaatin tutkielman kokeellisen osan alkamista) on kuvattu tarkemmin Rodewaldin (2013) väitöskirjan osatyössä II.

Kuolleisuusseurannan ja alustavan loiskartoituksen alkaessa 1.6.2010 kalat olivat 16 sisäaltaassa. Kalat olivat olleet näissä altaissa 1.3.2010 alkaen, jolloin kuhunkin altaaseen oli laitettu 2500 kalaa. Heinäkuussa tutkimuspopulaatio siirrettiin istukas- kasvatuksen käytäntöjen mukaisesti smolttivaihetta varten ulkoilmaisiiin siten, että poikashallissa tietyssä altaassa olleet kalat laitettiin omana ryhmänään vastaavan käsittelyn ulkoaltaaseen. Ulkoaltaiden lois- ja kuolleisuuskartoituksen alussa kussakin 16 ulkoaltaasta oli 2095 kalaa.

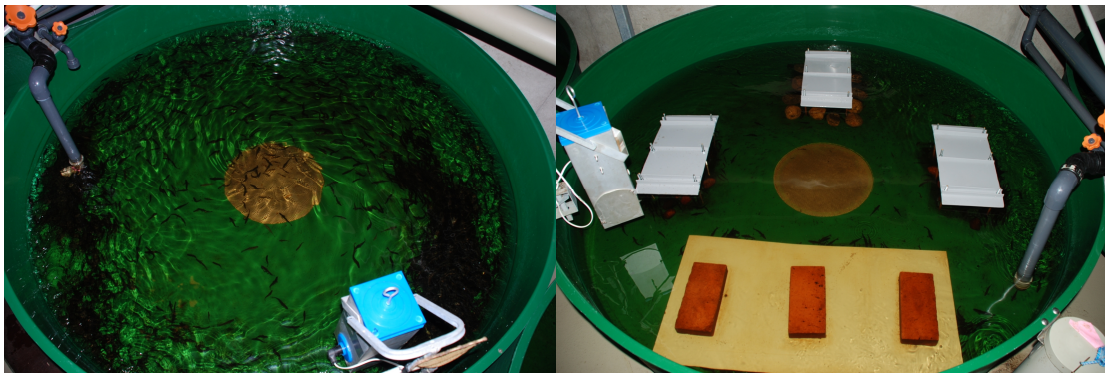
Sisäaltaista otettiin loistutkimusta varten näytteeksi yhteensä 241 kalaa kahden eri näytteenottokerran aikana. Sisäkasvatuksen aikana näytteitä otettiin vain laitosemojen poikasten standardi- ja virikealtaista, koska aluksi haluttiin tutkia nimenomaan kasvatustavan vaikutusta loisintaan. Ulkokasvatuksen aikana tutkittiin kuitenkin kaikkien käsittelyjen altaat, jotta myös emotaustan vaikutus voitiin ottaa huomioon. Ulkoaltaista näytteeksi otettiin yhteensä 533 kalaa kahden eri näytteenottokerran aikana. Altaista otettujen kalanäytteiden määrä perustui kokeneen tutkijan arvioon.

3.2 Kasvatusaltaat ja virikealtaiden olosuhdevaihtelu

Tutkimuksessa oli käytössä 16 pyöreää sisä- ja 16 ulkoallasta, joista puolet oli perinteisiä staattisen ympäristön kasvatusaltaita, standardialtaita, ja puolet virikealtaita, joissa kasvatusympäristön olosuhteet vaihtelivat. Kaikki sisäaltaat olivat pinta-alaltaan 3,2 m² ja valmistettu lasikuidusta; ulkoaltaat olivat 50 m²:n betonialtaita. Vesi saapui altaisiin putkea pitkin altaan reunalta ja poistui keskellä pohjaa olevan ritilän läpi. Kussakin altaassa kiinteä ruokinta-automaatti sijaitsi altaan reunalla ja kalat saivat kaupallista kalanrehua, jonka raekoko ja koostumus sovitettiin kalojen koon ja iän mukaan. Virikealtaissa kalat saivat samanaikaisesti kahden eri raekoon ravintopellettejä.

Standardialtaissa ei ollut edellä mainitun lisäksi muita rakenteita, mutta virikealtaisiin rakennettiin kaloille suojapaikkoja eri materiaaleista (kuvat 2 ja 3). Virikealtaiden vesitystä muunneltiin luonnossa esiintyvää satunnaisvaihtelua mukaillen (Taulukko 1). Virtausnopeuden ja -suunnan sekä vedenkorkeuden vaihdellessa myös ravinnon leviäminen virran mukana ja jakautuminen virikealtaissa muuttui.

Kaikkiin kasvatusaltaisiin tuli vesi Kivesjärvestä, tutkimusaseman yläpuolisesta vesistöstä. Tulevaa vettä hapetettiin tarvittaessa hapetuskoneella, muttei käsitelty muutoin. Sisäaltaisiin vesi saapui järvestä 7 m syvyydessä olevaa putkea pitkin ja ulkoaltaisiin johdettiin vesi 7 metrin ja 3 metrin syvyydessä olevien putkien vesien sekoituksena. Sama vesi ei kiertänyt altaasta toiseen, vaan vesi tuli altaisiin suoraan järvestä.



Kuva 2. Sisäaltaat: standardiallas ja virikeallas. © Petra Rodewald

Sisäaltaissa virikekasvatuksen suojapaikat koostuivat kolmesta metallijaloilla seisovasta 2 mm x 500 mm x 250 mm polystyreenilevystä, joiden alla oli 30 – 80 mm kokoisia pikkukiviä, ja (kuvasta poiketen) kahdesta muovilevystä (500 mm x 500 mm ja 500 mm x 1000 mm), joiden alla ja päällä oli tiiliä (60 mm x 120 mm x 260 mm).



Kuva 3. Ulkoaltaat: standardiallas ja virikeallas. © Pekka Hyvärinen

Ulkona virikealtaiden suojapaikat tehtiin 200 – 400 mm kokoisista kivistä sekä kahdesta 1500 mm x 1500 mm ja yhdestä 1500 mm x 3000 mm vesivanerilevystä, joiden alla oli kiviä ja päällä betonitiiliä (390 mm x 200 mm x 190 mm).

Taulukko 1. Veden virtaus ja suojapaikat sisä- ja ulkoaltaissa seurantakaudella; tutkimuspopulaatio siirrettiin sisäaltaista ulkoaltaisiin heinäkuun alussa. Tutkimuksessa oli mukana 16 sisä- ja 16 ulkoallasta, joista kahdeksan sisä- ja kahdeksan ulkoallasta olivat virikealtaita.

Aikaväli	Kasvatus- tapa	Allas	Veden syvyys cm	Veden virtaus L/s	Veden vaih- tuvuus krt/h	Virtauk- sen suunta	Suojapaikat
1.6. - 23.6.	Standardi	Sisä	25	0,9	4,1	myötäpv	Ei mitään
	Virike	Sisä	11	0,7	7,2	myötäpv	Pikkukivet + katokset
24.6. - 29.6.	Standardi	Sisä	25	0,9	4,1	myötäpv	Ei mitään
	Virike	Sisä	25	1,6	7,2	vastapv	Pikkukivet + katokset
30.6. - 7.7.	Standardi	Sisä	25	0,9	4,1	myötäpv	Ei mitään
	Virike	Sisä	25	1,6	7,2	myötäpv	Pikkukivet + katokset
7.7. - 25.7.	Standardi	Ulko	115	7,3	0,46	myötäpv	Ei mitään
	Virike	Ulko	40	10,4	1,9	myötäpv	Kivet + katokset
26.7. - 29.7.	Standardi	Ulko	115	7,3	0,46	myötäpv	Ei mitään
	Virike	Ulko	40	10,4	1,9	vastapv	Kivet + katokset
30.8. - 31.8.	Standardi	Ulko	115	7,3	0,46	myötäpv	Ei mitään
	Virike	Ulko	40	10,4	1,9	myötäpv	Kivet + katokset

3.3 Seurattavat muuttujat

Tutkimus jakautui kolmeen erilliseen osioon: kuolleisuuden seurantaan, sisäaltaiden loiskartoitukseen sekä ulkoaltaiden Ich-tartunnan ja valkopilkkutaudin ehkäisyn tutkimiseen. Allaskohtaista kuolleisuutta ja sen syitä seurattiin kolmen kuukauden ajan ensin sisäkasvatuksen aikana ja myöhemmin ulkoaltaissa. Tutkimuspopulaatiosta määritettiin kaikkiaan neljän eri näytteenottokerran aikana siinä esiintyvät loislajit ja niiden prevalenssit. Lisäksi arvioitiin allaskohtaista loisinfestaation voimakkuutta.

3.3.1 Kuolleisuus sisä- ja ulkoaltaissa

Seurantakauden aikana tarkasteltiin luonnollisten bakteeri- ja loistartuntojen aiheuttamaa kuolleisuutta ja siinä esiintyviä eroja eri käsittelyjen välillä. Allaskohtaista kuollei-

suutta seurattiin kalantutkimuslaitoksen henkilökunnan pitämän kirjanpidon avulla koko tutkimuksen ajan: 1.6. – 7.7.2010 sisäaltaissa ja 7.7. – 31.8.2010 ulkoaltaissa. Kuolleet kalat laskettiin ja poistettiin altaista päivittäin. Kuolleisuuden lähtiessä kasvuun kuolinsyydiagnostiikka tehtiin yleisesti käytössä olevin patologisin ja mikrobiologisin menetelmin Eviran Oulun toimipisteessä, jonne näytekalat kuljetettiin linja-autolla jäiden sekaan styrox-laatikkoon pakattuina.

Heti ulkoaltaisiin siirron jälkeen, ajalla 7. – 15.7.2010, kahdeksaan altaaseen (kahteen altaaseen kustakin käsittelytyypistä) johdettiin epähuomiossa vain pintavettä 3 metrin syvyydessä olevaa putkea pitkin. Muihin kahdeksaan altaaseen tuli 3 ja 7 metrin syvyydestä otetun veden sekoitusta, kuten oli tarkoituskin. Veden lämpötila vain pintavettä saaneissa altaissa nousi yli 20 °C:een, kun se toisissa altaissa pysytteli 16 – 18 asteen tuntumassa. Vesitys korjattiin 15.7. mutta pintavettä saaneita kahdeksaa allasta jouduttiin lääkitsemään Orimycin-lääkerekulla 17. – 26.7. niissä puhjenneen kolumnaaritaudin vuoksi.

3.3.2 Loiskartoitus sisäaltaissa

Sisäaltaissa tehtiin kaksi näytteenottoa (3. – 14.6. ja 14. – 15.7.), joiden tarkoituksena oli selvittää, mitä loisia lohenpoikasissa esiintyi sisäkasvatuskaudella, ennen ulkoaltaisiin siirtämistä. Näin pystyttiin kartoittamaan, missä vaiheessa seuranta-aikaa Ich-loista alkoi esiintyä tutkimuspopulaatiossa. Näytteenotto toteutettiin vain LV- ja LS-altaista, koska alkuun haluttiin tarkastella nimenomaan kasvatusympäristön – ei emotaustan – vaikutusta kalan iholla olevaan loispopulaatioon. Näin ollen tietoa VV- ja VS –altaiden loispopulaatiosta ennen ulkoaltaisiin siirtoa ei kerätty.

Ensimmäisellä näytteenottokerralla neljästä LS- ja LV-altaasta tutkittiin 20 kalaa. Tuolloin veden lämpötila vaihteli välillä 11,2 – 14,2 °C pysyen suurimman osan ajasta 12,5 °C:een tuntumassa. Veden happipitoisuus vaihteli tuolloin 7,8 – 9 mg/l, mutta oli useimpina päivinä 8,7 – 8,8 mg/l. Toisen näytteenoton aikaan jokaisessa sisäaltaassa oli jäljellä vain n. 300 kalaa, sillä suurin osa kaloista oli jo siirretty ulkoaltaisiin. Näytteeksi otettiin tällöin 10 kalaa kaikista neljästä LS- ja neljästä LV-altaasta. Toisen näytteenoton aikana veden lämpötila oli 18,1 – 18,4 °C ja happipitoisuus 7,3 mg/l. Sisäkasvatuskaudella seurannan aikana virikealtaissa pidettiin jatkuvasti yllä suurempaa veden vaihtuvuutta kuin standardialtaissa.

3.3.3 Ich-loisen esiintyvyys ulkoaltaissa

Tutkimuksessa haluttiin selvittää emotaustan sekä ympäristön virikkeellisyyden, erityisesti nopean veden virtauksen ja vaihtuvuuden, vaikutusta luonnollisen Ich-tartunnan aikaiseen loispreevalenssiin tutkimuspopulaatiossa. Loisinfectaatioiden vuodenaikaisvaihtelun ja kalantutkimusaseman vuosien kokemuksen perusteella pystyttiin ennustamaan Ich-infestaation puhkeavan ulkoaltaissa lämpimän veden aikaan.

Heinä-elokuussa tehtiin kaksi näytteenottoa, joissa jokaisesta VV-, VS-, LV- ja LS-altaasta tutkittiin 12 – 20 kalaa. Ulkoaltaissa standardialtaiden veden virtaus ja vaihtuvuus pidettiin perinteisen kasvatusmenetelmän mukaisina. Virikealtaissa taas säädettiin vedenpinta matalaksi ja tuloveden määrä suureksi, jolloin veden vaihtuvuus ja veden virtaus oli nopeampaa kuin standardialtaissa. Kaikkia ulkoaltaita täytyi ajalla 4. – 31.8.2010 hoitaa kahdesta viiteen vuorokauden välein formaliinikylvetyksin (3 litraa/allas/hoitokerta) luonnollisesti puhjenneen valkopilkkkutaudin torjumiseksi.

Heinäkuun näytteenotossa tutkittiin näytteet kaikista altaista kahden päivän sisällä (27. – 28.7.), mutta elokuussa villi- ja laitospoikasten näytteenottokertojen välissä kului viikko (18. – 19.8. ja 24. – 25.8.). Heinäkuussa toteutetun näytteenoton aikana veden lämpötila oli 19 – 19,4 °C ja happipitoisuus 8,2 – 8,3 mg/l. Elokuun ensimmäisen näytteenoton aikana (laitosempojen poikaset) veden lämpötila oli 18,6 – 19,2 °C ja happipitoisuus 7,3 – 7,5 mg/l. Elokuussa villiemojen poikasten näytteitä tutkittaessa veden lämpötila oli 16,2 – 16,6 °C ja happipitoisuus 7,7 – 7,8 mg/dl.

3.4 Näytteenotossa ja -tutkimisessa käytetyt menetelmät

Näytekalojen poimimisesta ja altaiden häirinnästä aiheutuvan lyhytaikaisen stressin vaikutusten eliminoimiseksi kaikki tutkimusaltaat käsiteltiin samalla tavalla, vaikka ensimmäisissä näytteenotoissa villiemojen poikasten altaista ei kalanäytteitä otettukaan. Limanäytteitä ottamassa ja mikroskopoimassa oli lisensiaatin tutkielman tekijän lisäksi neljä henkilöä, joilla oli runsaasti kokemusta kalojen loisnäytteiden tutkimisesta. Käytännön syistä sokkoutusta ei ollut, koska henkilö, joka tutki iholimanäytteitä, piti samalla kirjaa kalojen kasvatusaltaiden numeroista ja siitä, oliko kyseessä standardi- vai virikeallas. Iholimanäytteenottotapaa ja käytettävää nukutusainetta jouduttiin muuttamaan kesken tutkimuksen.

3.4.1 Sisäaltaiden näytteenotto

Altaan reunoille kerääntynyttä kalamassaa häirittiin muutamalla haavinpyöräytyksellä ennen näytteenottoa. Virikealtaista poistettiin näytekalojen haavimisen ajaksi metallialoilla seisovat muoviset suojakatokset. Näytteenotossa avustava henkilö koputteli virikealtaiden muovisuojien kattoa haavimisen aikana, jotta piilossa olevat kalat lähtisivät liikkeelle suojista. Yksi henkilö haavi kalat satunnaisesti eri puolilta allasta viidellä haavin kahmaisulla siten, että kussakin haavillisessa oli n. 4 kalaa. Näytteeksi ei otettu alle 70 mm mittaisia poikasia, sillä tätä pienemmät poikaset ovat poikkeuksellisia yksilöitä kyseisessä tuotantovaiheessa.

Näytteiden käsittely ja tutkiminen tapahtui poikashallissa, josta kalanäytteet otettiin. Kalat kuljetettiin vesisangossa muutaman kymmenen metrin matka altaalta tutkimuspöydän viereen. Iholimanäyte haluttiin ottaa elävältä kalalta, jotta loispopulaatiossa ei ehtisi tapahtua kuolemanjälkeisiä muutoksia; näytteenoton helpottamiseksi kalat nukutettiin näytteenottoa varten. Ensimmäisellä näytteenottokerralla kesäkuussa kalat nukutettiin liuoksella, jossa oli 60 ml MS 222 -varastoliuosta (trikaiinimetaanisulfo-naatti 100 mg/l) viidessä litrassa vettä. Heinäkuun näytteenotossa kalojen nukutus tapahtui liuoksella, jossa oli 2 ml neilikkaöljy-varastoliuosta 5 litrassa vettä. Nukutusainetta jouduttiin vaihtamaan, koska tutkimusasemalla ei ollut enää käytettävissä riittävästi MS 222 -varastoliuosta.

Kerralla nukutettiin kahdesta neljään kalaa ja nukutusaineen vaikutettua kalat mitattiin ja punnittiin. Saadut mittaustulokset kirjattiin tietokoneelle. Iholimanäyte otettiin elävältä nukutetulta kalalta toisen rintaevän alta kyljestä noin 1 cm² alueelta yhdellä kevyellä 1,8 x 1,8 cm peitinlasin vedolla. Peitinlasit asetettiin juoksevilla numeroinnilla merkityille objektilaseille ja peitinlasin viereen lisättiin tippa tutkittavasta altaasta peräisin olevaa vettä näytteen leviämisen helpottamiseksi. Tutkittu kala lopetettiin leikkaamalla pää poikki saksilla aivojen takaa.

3.4.2 Ulkoaltaiden näytteenotto

Ulkoaltaiden suuremman koon vuoksi näytekalojen haaviminen toteutettiin eri tavalla kuin sisäaltaista. Näytteitä oli haavimassa kaksi kalantutkimusaseman tutkimusmestaria. Kalat haavittiin yksi kerrallaan eri puolilta allasta: keskeltä, reunoilta ja virikealtaissa suojapaikkojen viereltä. Standardialtaiden vedenpinta laskettiin matalaksi näytteenoton ajaksi.

Näytekalat kuljetettiin mönkijällä muutaman sadan metrin matka laimeaa nukutusaine-liuosta sisältävässä ämpärissä ulkoaltailta tutkimusaseman laboratorioon. Kerralla kuljetettiin 10 – 13 kalaa. Nukutusaineena käytettiin neilikkaöljyvarastoliuosta, jota lisättiin 2 millilitraa 10 litraan vettä. Liuos oli laimeampi kuin aikaisemmassa näytteenotossa, sillä kalojen tahdottiin pysyvän varmasti hengissä ulkoaltailta laboratorioon kuljetuksen ajan.

Nukutetut kalat punnittiin, mitattiin ja lopetettiin katkaisemalla niska sakilla. Lopetetun kalan kyljestä raapaistiin rintaevästä selkäevään ulottuvalta alueelta 1,8 x 1,8 cm peitinlasilla iholimanäyte. Jos näytteen limamäärä ei objektilasille asetettuna riittänyt täyttämään kokonaan peitinasin alle jäävää aluetta, lisättiin lasille tippa kuljetusämpärissä ollutta nukutusaineliuosta.

3.4.3 Näytteiden tutkiminen

Iholimanäytteet mikroskoipoitiin valomikroskoopilla 10x-objektiivilla ja kaikki vähänkin peitinasin alla olevat loiset tunnistettiin ja laskettiin. Yhdellä mikrosopointikerralla tutkittiin kahdesta neljään kalan näytteet, jonka jälkeen seuraavat näytteet preparoitiin. Loisten määrää ilmaistiin kunkin löydetyn loislajin kohdalla kuusiasteisella luokituksella: 0 = ei loista, 1 = 1-5 loista, 2 = 6-20 loista, 3 = 21-100 loista, 4 = 101-500 loista ja 5 = yli 500 loista.

Limanäytteitä oli ottamassa ja mikroskoipoimassa samanaikaisesti yhdestä kolmeen tutkijaa. Kokonaisuudessaan näytteiden tutkimiseen osallistui viisi eri henkilöä. Näytteiden tutkijat kävivät yhdessä läpi näytteenottotavan ja loismääräluokituksen, jotta tulokset olisivat keskenään vertailukelpoisia.

3.5 Aineiston käsittely ja tilastolliset menetelmät

Kumulatiiviset kuolleisuuskuvaajat sisä- ja ulkokasvatuksen aikaisesta kuolleisuudesta piirrettiin Microsoft® Office Excel 2003 -taulukkolaskentaohjelman avulla. Myös allaskohtaiset kuolleisuusprosentit laskettiin ja niiden kuvaajat piirrettiin Microsoft® Office Excel 2003 -ohjelmalla. Allaskohtaisten kuolleisuusprosenttien luottamusvälit määritettiin binomiaaliseen jakautumiseen perustuvan 95 % luottamusvälin avulla (Casella & Berger 1990). Käsittelykohtaisia eroja kuolleisuudessa arvioitiin saatujen kuvaajien perusteella.

Käsittelykohtaiset loisprevalenssit laskettiin IBM® SPSS® Statistics 21 -ohjelmalla ja prevalenssien tilastollinen merkitsevyys määritettiin binomiaaliseen jakau-

tumiseen perustuvan 95 % luottamusvälin avulla (Casella & Berger 1990). Assosiaatio loisinfestaation ja kasvatusmenetelmän sekä emotaustan välillä määritettiin tilastollisesti Fisherin eksaktilla testillä. Allaskohtaiset loisinfestaatiota ja sen intensiteettiä kuvaavat diagrammit piirrettiin Microsoft® Office Excel 2003 -ohjelman avulla. Loisinfectaation ajallista kehittymistä arvioitiin saatujen kuvaajien perusteella.

4 TULOKSET

Sisäkasvatuksen aikana otetuissa loisnäytteissä todettiin ainoastaan *Trichodina*-loista. Ulkoaltailla esiintyi heinäkuussa sekä *Trichodina*- että Ich-loista ja elokuussa vain Ich-loista. Sisäaltaissa ei seurantakauden aikana esiintynyt taudinpurkauksia, eikä kuolleisuutta näin voitu yhdistää tiettyyn sairauteen. Heinäkuussa kalat puolessa ulkoaltaita sairastuivat *Flavobacterium columnare* -bakteerin aiheuttamaan kolumnaaritautiin, jonka aikana esiintyi korkeaa kuolleisuutta ennen antibioottihoidon aloittamista. Heinä-elokuussa kaikissa ulkoaltaissa oli Ich-tartunta, jonka aiheuttama valkopilkkutauti johti lievästi kohonneeseen kuolleisuuteen osassa tutkimusaltaista. Elokuun ajan altaita hoidettiin formaliinikylvetyksin.

4.1 Kuolleisuus sisä- ja ulkoaltaissa

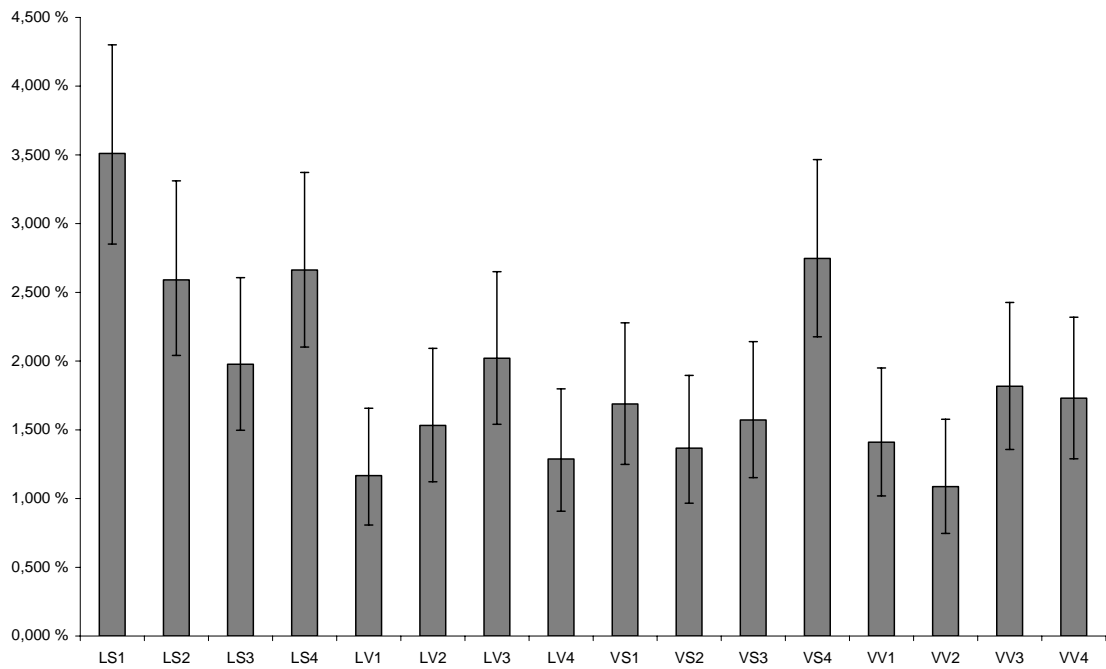
Sisäaltaiden allaskohtaista kuolleisuutta kuvaavan diagrammin (kuva 4) perusteella voidaan todeta, että vaihtelu kuolleisuudessa altaiden välillä oli sisäkasvatuskaudella pientä, parin prosenttiyksikön luokkaa. Korkeimmat kuolleisuusprosentit mitattiin standardialtaista ja matalimmat virikealtaista. Sisäaltaiden kumulatiivinen kuolleisuus - kuvaajien avulla havaittiin ero kasvatusapojen välillä laitosemojen poikasissa: standardialtaissa kuolleisuus on ollut korkeampaa kuin virikealtaissa (kuva 5a). Villiemojen poikasilla selkeää eroa kuolleisuudessa kasvatusavan suhteen ei näyttäisi olevan (kuva 5b). Sisäkasvatuskaudella allaskohtainen kuolleisuus vaikuttaa kokonaisuudessaan olleen alhaisempaa villiemojen poikasissa kuin laitosemojen poikasissa, erityisesti standardialtaiden osalta (kuvat 4 ja 5).

Ulkokasvatuksen aikana esiintyi kaksi luonnollista taudinpurkausta, joihin liittyi kohonnutta kuolleisuutta osassa tutkimusaltaista: heinäkuussa kolumnaaritauti puolessa tutkimusaltaita ja heinä-elokuussa valkopilkkutauti kaikissa altaissa. Kokonaiskuolleisuus ulkoaltailla flavobakteeritartunnan sairastaneissa altaissa oli huomatta-

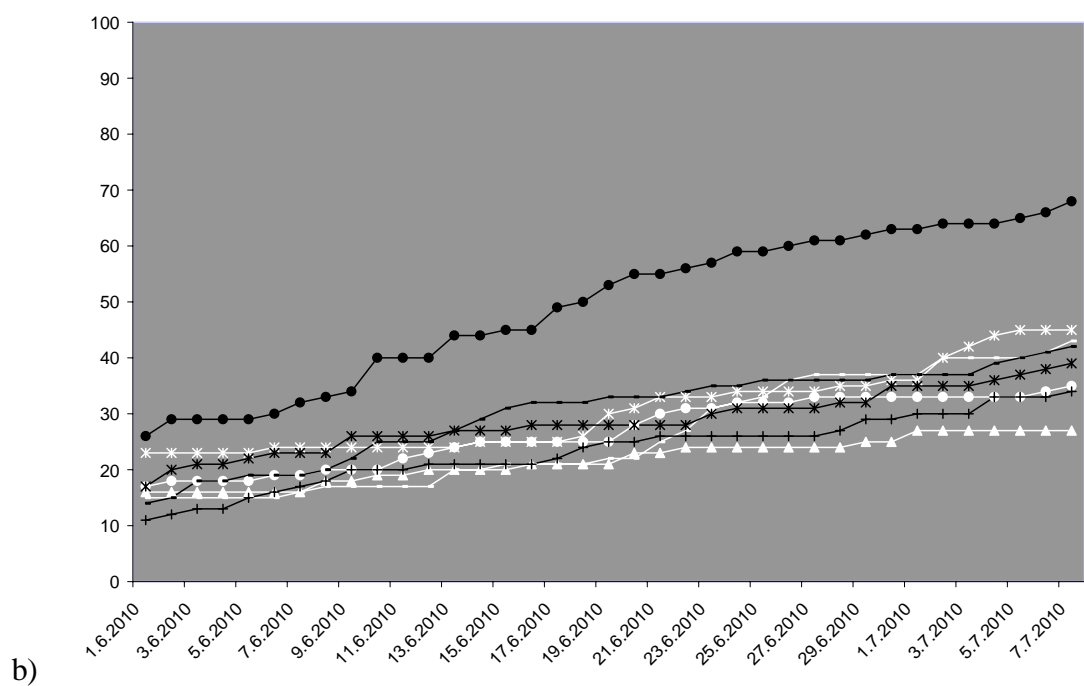
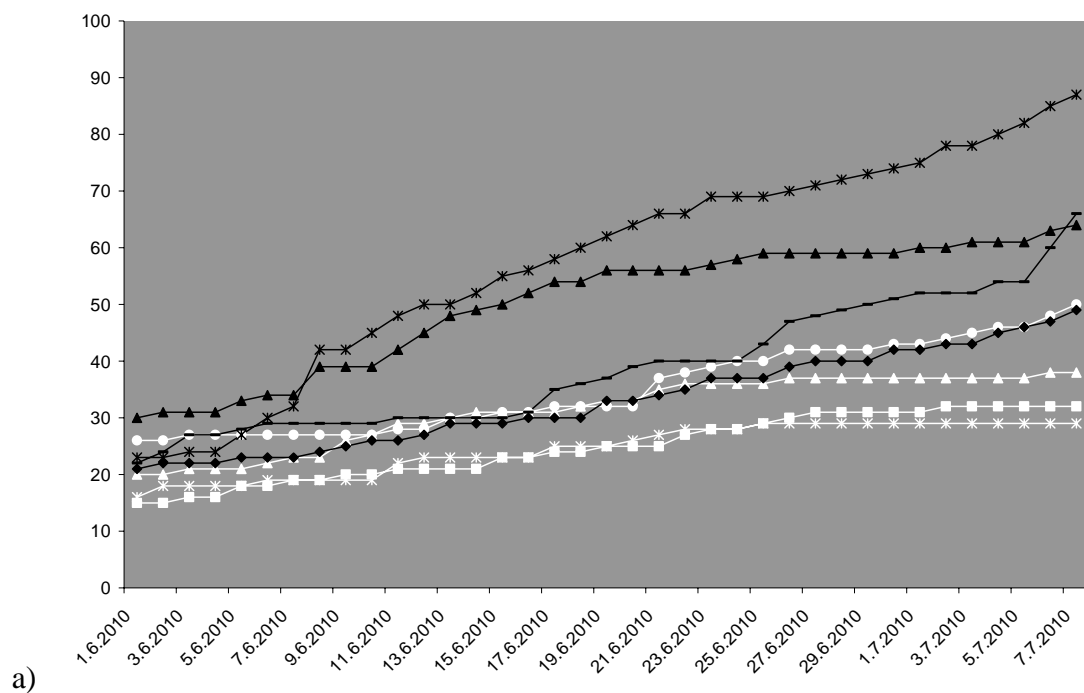
vasti korkeampaa kuin toisessa allasryhmässä. Valkopilkun aiheuttama kuolleisuus oli selvästi vähäisempää kuin kuolleisuus kolumnaaritautiin.

Flavobakteeritartunnan sairastaneissa ulkoaltaissa äkillinen nousu kuolleisuudessa tapahtui välillä 13. – 18.7. ja kuolleisuus tasoittui muutamassa päivässä 17.7. aloitetun antibioottikuurin jälkeen (kuva 6a). Myöhemmin seurantajakson aikana kyseisissä altaissa ei juuri esiintynyt kuolleisuutta. Muissa altaissa kuolleisuus lähti tasaiseen, hitaaseen kasvuun 19.7. aikoihin Ich-tartunnan alkaessa (kuva 6b). Erityisesti kahdessa standardialtaassa, joissa ei ollut sairastettu flavobakteeritartuntaa, aiheutui valkopilkun johdosta muita altaita korkeampaa kuolleisuutta. Äkillisiä nousuja päiväkohtaisessa kuolleisuudessa tapahtui näissä altaissa heinäkuun lopussa ja elokuun puolivälissä.

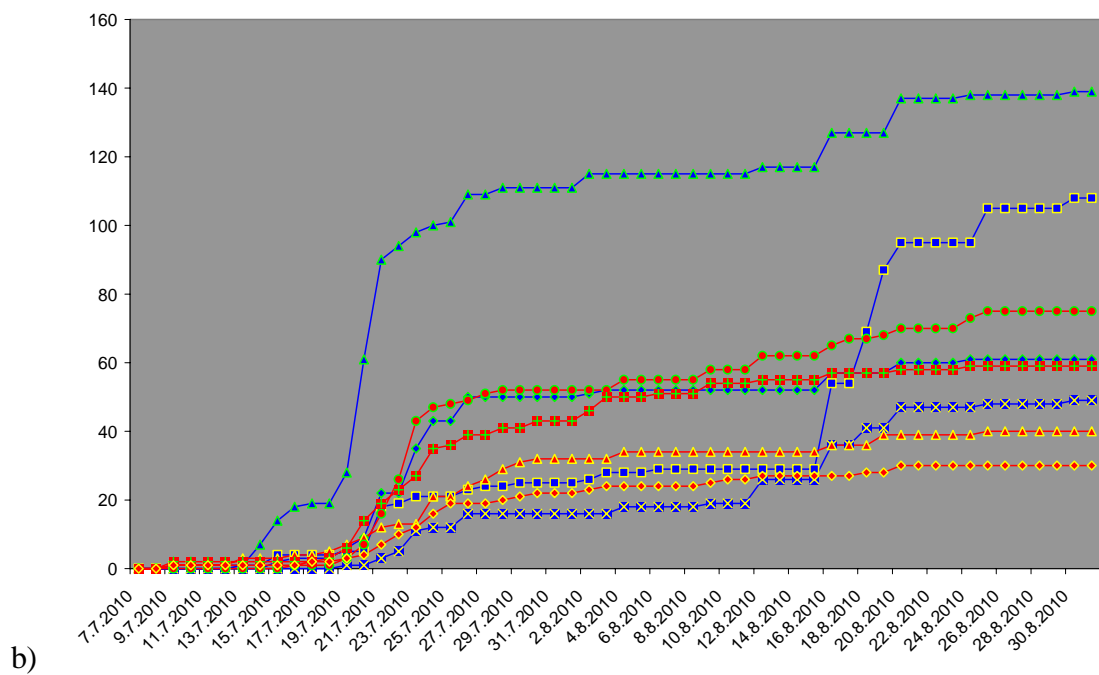
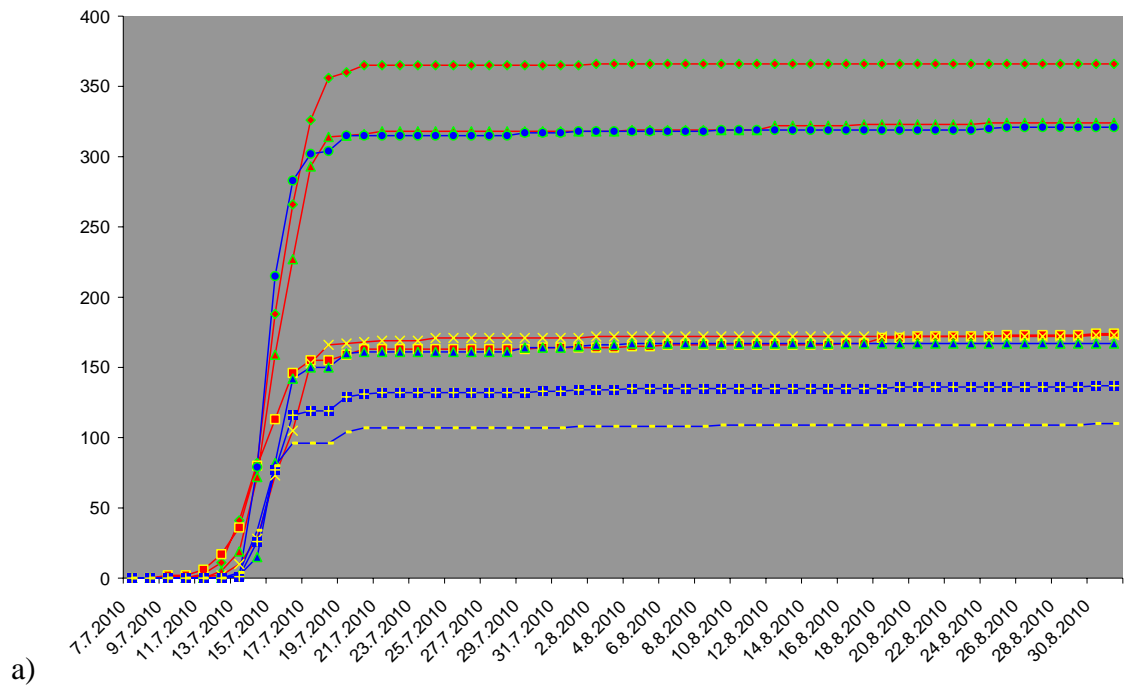
Ulkokasvatuksen aikana kuolleisuus oli pääosin vähäisempää laitos- kuin villiemojen poikasissa (kuva 6). Eroja kuolleisuudessa virike- ja standardialtaiden välillä on hankala arvioida, sillä yksittäisten altaiden väliset erot ovat suuria. Kolumnaaritaudin aiheuttama kuolleisuus oli vähäintä LS-altaissa ja korkeinta VV-altaissa. Kaikissa flavobakteeritartuntaan sairastuneissa altaissa kuolleisuus oli selvästi normaalia voimakkaampaa heinäkuussa (kuva 7a) ja hyvin alhaista elokuussa (kuva 7b). Altaissa, joissa flavobakteeritartuntaa ei esiintynyt, kuolleisuudessa ei ollut suurta eroa heinä- ja elokuun välillä (kuva 7).



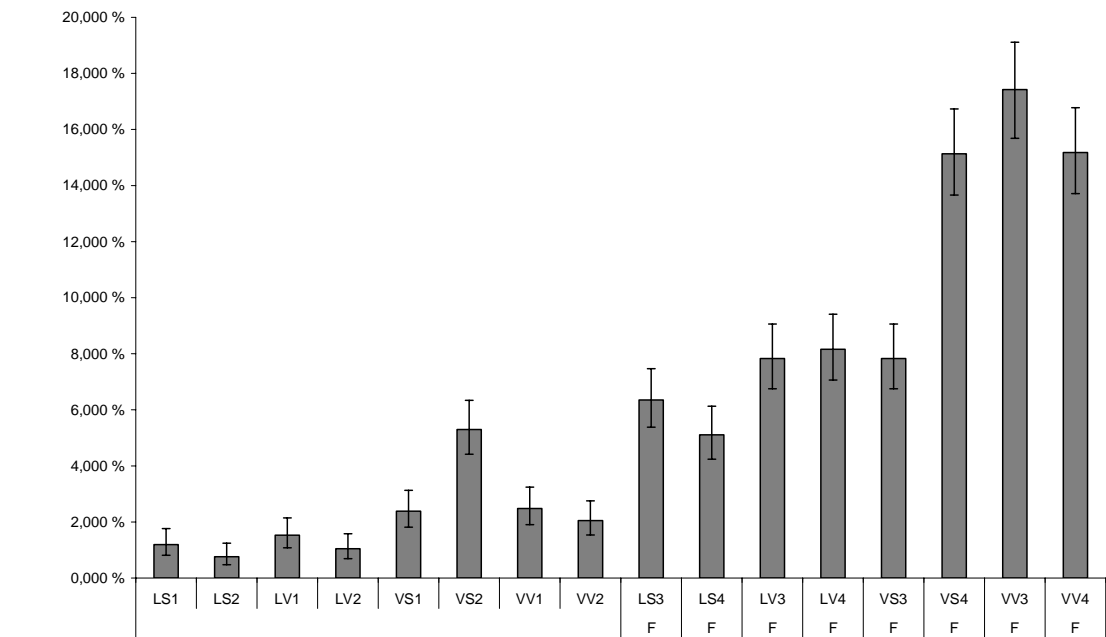
Kuva 4. Allaskohtainen kuolleisuus sisäkasvatuksen aikana 1.6. - 7.7.2010. Pystyakselilla on seuranta-aikana kuolleiden kalojen prosenttiosuus altaan kalamäärästä jakson alussa ja vaaka-akselilla ovat 16 tutkimusallasta käsittelyittäin (LS = ”laitos-standardi”, LV = ”laitos-virike”, VS = ”villi-standardi” ja VV = ”villi-virike”). Pylväiden virhepal-
kit kuvaavat allaskohtaiselle kuolleisuusprosentille laskettuja 95 %:n luottamusvälejä.



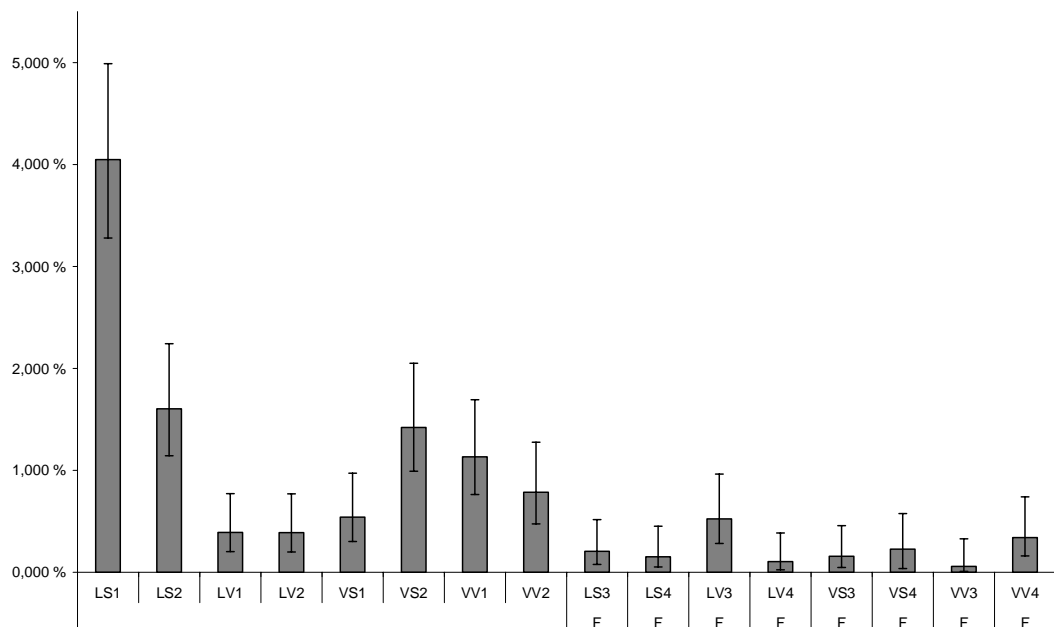
Kuva 5. Kumulatiivinen kuolleisuus sisäkasvatuskaudella 1.6. – 7.7.2010 laitosemojen poikasilla (a) ja villiemojen poikasilla (b). Pystyakselilla on kuolleiden kalojen lukumäärä. Kukin käyrä kuvaa tietyn tutkimusaltaan kuolleisuuskertymää: mustat käyrät ovat standardialtaita ja valkoiset virikealtaita.



Kuva 6. Kumulatiivinen kuolleisuus ulkokasvatuskaudella 7.7. – 31.8.2010 altaissa, joissa oli kolumnaaritauti (a) ja altaissa, jotka eivät sairastuneet kolumnaaritautiin (b). Pystyakselilla on kuolleiden kalojen lukumäärä. Käyrät kuvaavat allaskohtaista kuolleisuuskertymää: siniset käyrät ovat standardialtaita ja punaiset virikealtaita; vihreä reunus tarkoittaa villiemojen ja keltainen laitosemojen poikasia.



a)



b)

Kuva 7. Allaskohtainen kuolleisuus ulkoaltailla (a) kolumnaaritaudin aikana 7.7. – 31.7.2010 ja (b) valkopilkkutaudin aikana 1.8. – 31.8.2010. Pystyakselilla on seuranta-aikana kuolleiden kalojen prosenttiosuus altaan kalamäärästä jakson alussa ja vaaka-akselilla ovat 16 tutkimusallasta käsittelyittäin (LS = ”laitos-standardi”, LV = ”laitos-virike”, VS = ”villi-standardi” ja VV = ”villi-virike”). Vaaka-akselin ”F” kirjain tarkoittaa, että kyseisessä altaassa oli heinäkuussa *Flavobacterium columnare* -tartunta. Pylväiden virhepalkit kuvaavat allaskohtaiselle kuolleisuusprosentille laskettuja 95 %:n luottamusvälejä.

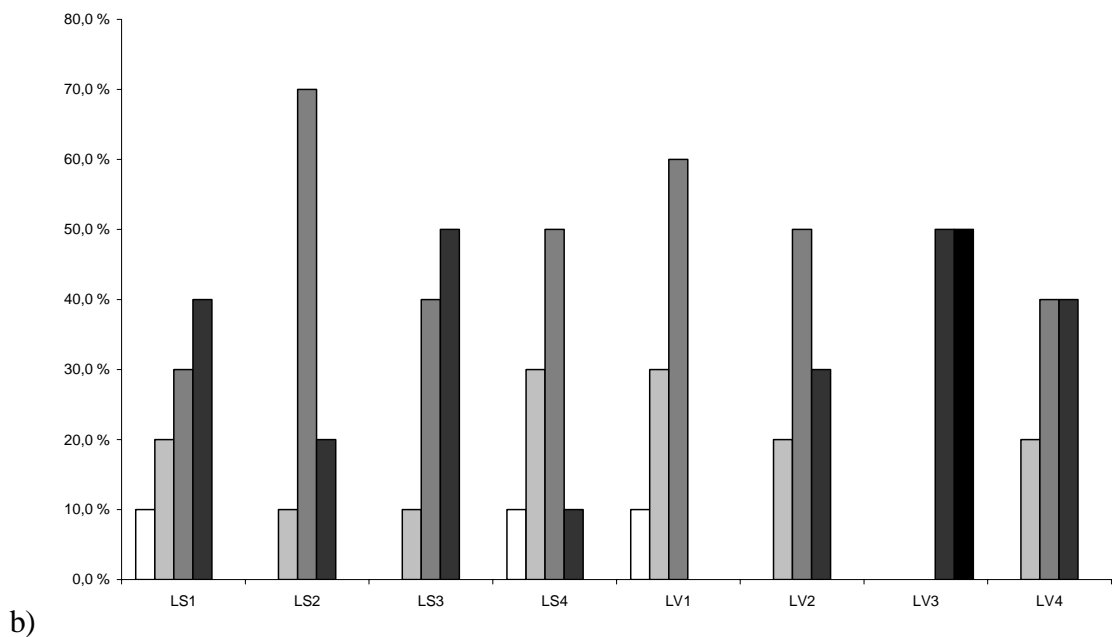
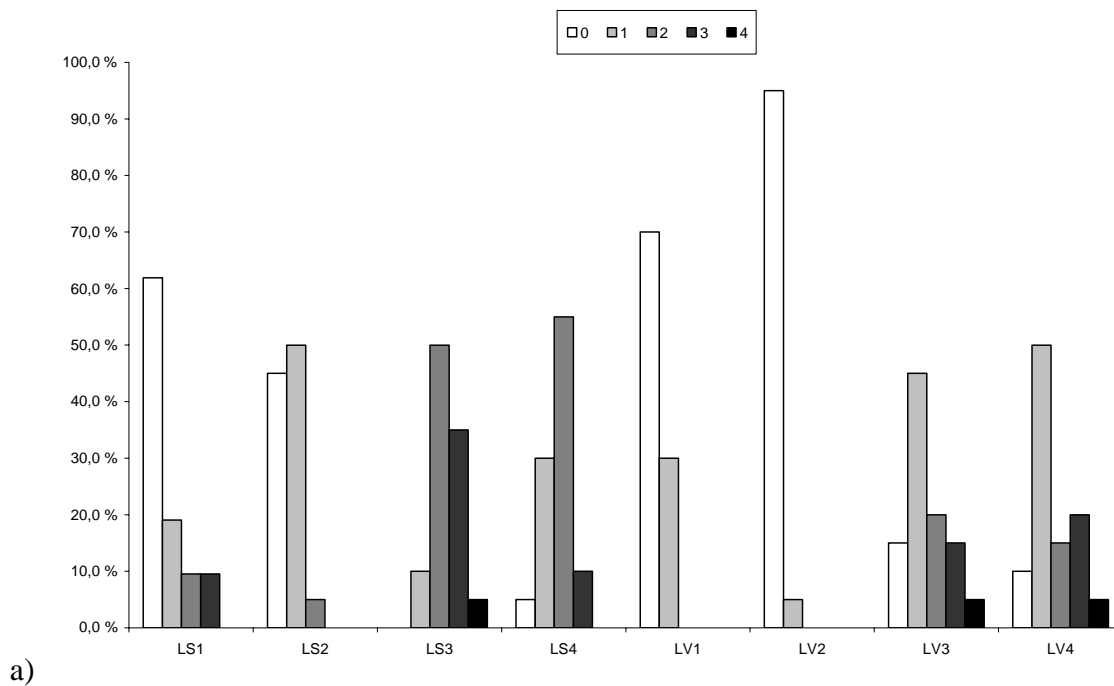
4.2 Loiskartoitus sisäaltaissa

Sisäkasvatuskaudella esiintyi tutkituissa laitosemojen poikasissa vain *Trichodina*-loistyyppiä, jota todettiin kesäkuun näytteenotossa suurimmasta osasta tutkittuja kaloja ja heinäkuussa lähes kaikilta sisäaltaista tutkituilta kaloilta (taulukko 2). Kaloissa todettiin suuriakin loismääriä ilman, että altaissa esiintyi lisääntynyttä kuolleisuutta loisten johdosta. Kesäkuun tuloksissa havaittiin yhteys kasvatuksen ja *Trichodina*-prevalenssin välillä: *Trichodina*-loista todettiin enemmän standardi- kuin virikealtaissa. Prevalenssin luottamusvälit olivat kuitenkin laajat ja menivät hieman päällekkäin. Heinäkuussa eroja prevalenssissa käsittelyjen välillä ei ollut.

Trichodina-infestaatio vaikuttaa olleen voimakkaampi ja yksittäisten kalojen kantamat loismäärät suurempia heinäkuussa kuin kesäkuussa sisäaltailla (kuva 8). Allaskohtainen vaihtelu loisinfestaation intensiteetissä oli suurta, joten eroja kasvatustapojen välillä on vaikea arvoida.

Taulukko 2. *Trichodina*-prevalenssit ja niiden tilastollinen merkitsevyys kasvatusmenetelmittäin laitosemojen poikasissa kesäkuun (n = 161) ja heinäkuun (n = 80) sisäaltaiden näytteenotoissa. Prosenttiluvun alla on sulkeissa prevalenssille laskettu 95 % luottamusväli.

	Standardi	Virike	Fisherin eksakti P-arvo
Kesäkuu	71,6 % (61,0 – 80,3)	52,5 % (41,7 – 63,1)	0,015
Heinäkuu	95,0 % (83,5 – 98,6)	97,5 % (87,1 – 99,6)	1,000



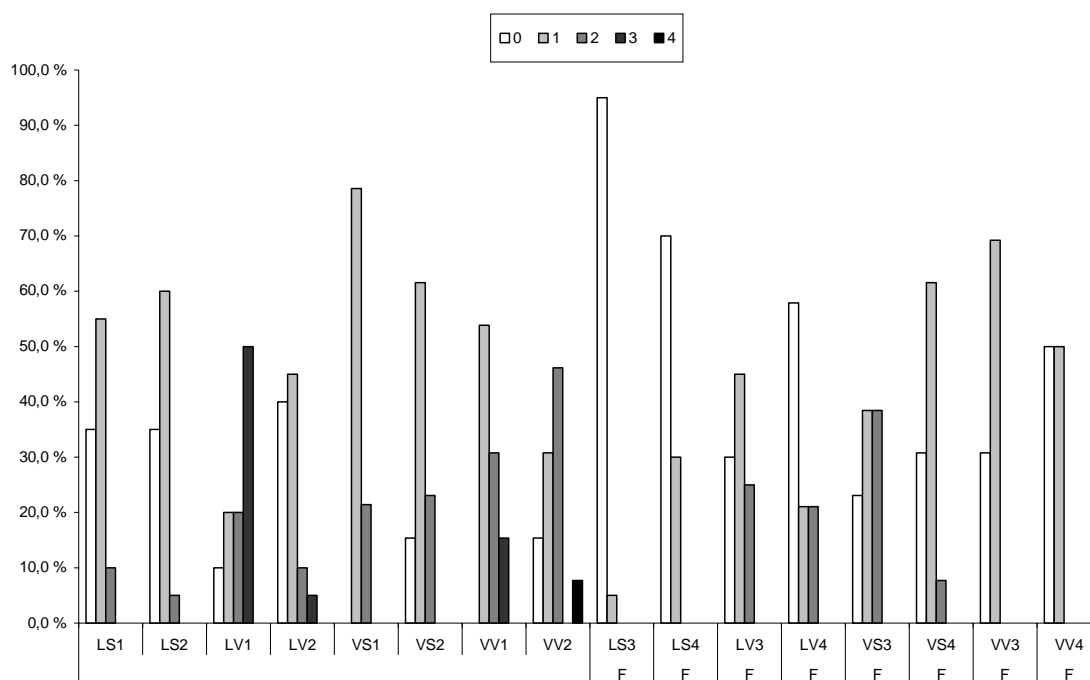
Kuva 8. *Trichodina*-infestaation voimakkuus (a) kesäkuun ja (b) heinäkuun sisäaltaiden näytteenotoissa. Loisten määrää tutkitussa näytteessä ilmaistiin asteikolla 0 – 4 (0 = ei loista, 1 = 1-5 loista, 2 = 6-20 loista, 3 = 21-100 loista, 4 = 101-500 loista). Pylvään tummuusaste kuvaa näytteestä määritettyä loislukua: mitä tummempi väri, sitä enemmän loisia. Pystyakselilla on tietystä loislukussa olleiden näytekalojen %-osuus kyseisestä altaasta tutkittujen kalojen määrästä (a. n = 20-21; b. n = 10) ja vaak akselilla on tutkitut altaat käsittelyittäin (LS = ”laitos-standardi”, LV = ”laitos-virike”). Pylväiden summa samassa altaassa samassa kuussa on 100 %.

4.3 Ich-infestaatio ulkoaltaissa

Ulkoaltaissa esiintyi heinäkuussa samanaikaisesti Ich- ja *Trichodina*-loisia ja elokuussa vain Ich-loista. Heinäkuussa *Trichodina*-loista tavattiin ulkoaltaissa vähemmän kuin sisäaltaissa ja yksittäisissä kaloissa havaittu loismäärä vaikuttaa olleen pienempi kuin sisäkasvatuksen aikana (kuva 9).

Kasvatuksen ja emotaustan sekä *Trichodina*-prevalenssin välillä havaittiin tilastollisia yhteyksiä: laitosemojen poikasilla prevalenssi oli merkitsevästi alhaisempi standardi- kuin virikealtaissa ja standardialtaissa prevalenssi oli merkitsevästi korkeampi villiemojen kuin laitosemojen poikasilla (taulukko 3). *Trichodina*-prevalensseissa oli kuitenkin altaiden välillä suurta vaihtelua ja loisinnan voimakkuudessa allaskohtaisia eroja, jotka eivät vaikuta jakautuneen käsittelyittäin (kuva 9). Eroja *Trichodina*-infestaation voimakkuudessa on pikemminkin havaittavissa sairastetun kolumnaaritaudin suhteen: bakteeritaudin saaneissa altaissa loismäärä vaikuttaa olleen vähäisempi kuin altaissa, joissa tautia ei ollut (kuva 9). Elokuussa formaliinikylvetysten alettua *Trichodinaa* ei enää esiintynyt tutkimusaltaissa.

Heinäkuussa valkopilkkutaudin ja emotaustan välillä havaittiin yhteys: Ich-prevalenssi oli standardialtaissa alhaisempi villiemojen kuin laitosemojen poikasissa, mutta luottamusvälit menivät hieman päällekkäin (taulukko 4a). Lisäksi villitaustaisilla Ich-prevalenssi oli alhaisempi virike- kuin standardialtaissa, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Elokuussa käsittelyjen väliset erot Ich-prevalenssissa olivat selkeitä ja emotaustan osalta kiistatta tilastollisesti merkitseviä: valkopilkkua esiintyi enemmän standardi- kuin virikealtaissa ja laitos- kuin villiemojen poikasissa (taulukko 4b). Kuitenkin käsittelykohtaisille Ich-prevalensseille lasketut luottamusvälit menivät kasvatustaustan osalta hieman päällekkäin. Allaskohtaiset erot Ich-prevalensseissa olivat niin heinä- kuin elokuussakin suuria (kuva 10), mikä tekee käsittelyjen välisten erojen arvioimisen haastavaksi.



Kuva 9. *Trichodina*-infestaation voimakkuus heinäkuussa ulkoaltaiden näytteenotossa. Pylvään tummuus kuvaa loislukkaa (0 – 4): mitä tummempi väri, sitä enemmän loisia. Pystyakselilla on tietyssä loislukassa olleiden näytekalojen %-osuus kyseisestä altaasta tutkittujen kalojen määrästä (n = 12 – 20) ja vaaka-akselilla on tutkitut altaat käsittelyittain (LS = ”laitos-standardi”, LV = ”laitos-virike”, VS = ”villi-standardi” ja VV = ”villi-virike”). Vaaka-akselin ”F” kirjain tarkoittaa, että kyseisessä altaassa oli heinäkuussa *Flavobacterium columnare* -tartunta. Pylväiden summa samassa altaassa samassa kuussa on 100 %.

Taulukko 3. *Trichodina*-prevalenssit ja niiden tilastollinen merkitsevyys käsittelyittain heinäkuun ulkoaltaiden näytteenotossa (n = 263). Prosenttiluvun alla on sulkeissa prevalenssille laskettu 95 % luottamusväli.

	Standardi	Virike	Fisherin eksakti p-arvo
Laitos	41,3 % (31,2 – 52,3)	65,8 % (54,8 – 75,3)	0,002
Villi	83,0 % (70,7 – 90,8)	76,5 % (63,3 – 86,0)	0,469
Fisherin eksakti p-arvo	< 0,001	0,241	

Tutkituilla kaloilla todettiin Ich-tartunnassa pääosin yksittäisiä loisia, mutta elokuussa muutamassa altaassa oli myös voimakkaammin infestoituneita yksilöitä (kuva 10). Näitä kaloja, joilla havaittiin 6 – 500 loista, esiintyi yleisemmin standardi- kuin virikealtaissa. Altaissa, joissa Ich-infestaatio oli voimakas, oli myös eniten kuolleisuutta valkopilkkutaudin aikana (kuvat 7b ja 10b). Kolumnaaritaudin sairastaneissa altaissa yksittäisen kalan kantama loismäärä ja altaan loisprevalenssi vaikuttaa olleen vähäisempi kuin flavobakteeritaudilta säästyneissä altaissa (kuva 10).

Kolumnaaritaudin sairastaneilla altailla Ich-infestations dynamiikka on ollut hieman erilainen kuin altaissa, joissa tätä bakteeritautia ei ollut (taulukko 5). Heinäkuun näytteenotossa tautiin sairastumattomilla havaittiin yhteys villiemojen poikasilla Ich-tartunnan ja kasvatustavan välillä: VS-altaissa Ich-prevalenssi oli alhaisempi kuin VV-altaissa (taulukko 5a). Kolumnaaritaudin sairastaneissa altaissa eroa edellä mainittujen käsittelyjen välillä ei ollut; sen sijaan niissä Ich-prevalenssi oli suurempi LS- kuin LV-altaissa ja vastaavasti suurempi LS- kuin VS-altaissa (taulukko 5b). Näissä kolmessa tapauksessa Ich-prevalensseille lasketut luottamusvälit olivat kuitenkin laajoja ja menivät hieman päällekkäin.

Taulukko 4. Ich-prevalenssit ja niiden tilastollinen merkitsevyys käsittelyittäin ulkoaltailla (a) heinäkuussa (n = 263) ja (b) elokuussa (n = 270). Prosenttiluvun alla on sulkeissa prevalenssille laskettu 95 % luottamusväli.

(a)	Standardi	Virike	Fisherin eksakti p-arvo
Laitos	47,5 % (36,9 – 58,3)	40,5 % (30,4 – 51,5)	0,426
Villi	24,5 % (14,9 – 37,5)	41,2 % (28,8 – 54,9)	0,095
Fisherin eksakti p-arvo	0,011	1,000	
(b)	Standardi	Virike	Fisherin eksakti p-arvo
Laitos	67,5 % (56,6 – 76,8)	47,4 % (36,7 – 58,3)	0,015
Villi	39,3 % (27,6 – 52,4)	16,1 % (8,7 – 27,8)	0,011
Fisherin eksakti p-arvo	0,002	< 0,001	

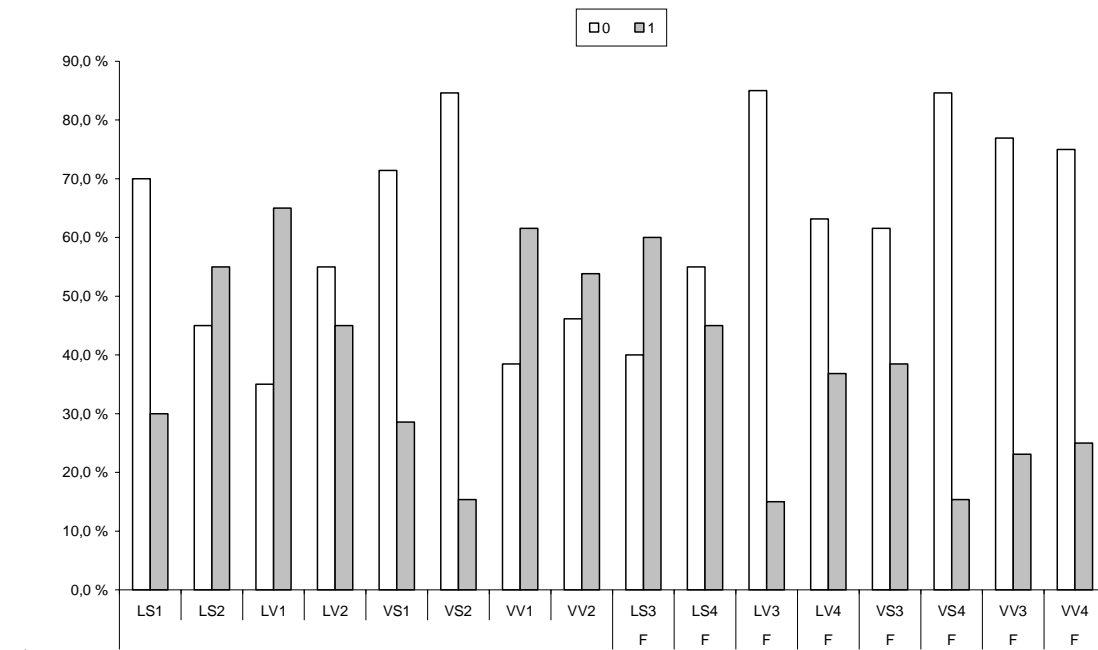
Elokuun näytteenotossa havaittiin kolumnaaritaudista vapaiksi jääneissä altaissa voimakas tilastollinen yhteys Ich:n esiintyvyyden ja kasvatus- sekä emotaustan välillä (taulukko 5c): villiemojen poikasilla prevalenssi oli molemmissa kasvatustavoissa huomattavasti pienempi kuin laitosemojen poikasilla ja laitosemojen poikasissa esiintyi enemmän Ich:iä standardi- kuin virikealtaissa. Lisäksi villiemojen poikasilla havaittiin suurempi Ich-prevalenssi standardi- kuin virikealtaissa, mutta tämä yhteys kasvatuksen ja loisinnan välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevä.

Kolumnaaritaudin sairastaneissa altaissa havaittiin elokuussa eroja LV- ja VV- sekä VS- ja VV-altaiden välillä Ich-infestaatioissa (taulukko 5d). Virikealtaissa prevalenssi oli suurempi laitos- kuin villiemojen poikasilla, vaikkakin luottamusvälit menivät hieman päällekkäin. Villiemojen poikasilla prevalenssi oli suurempi standardi- kuin virikealtaissa, mikä kuitenkin ei ollut tilastollisesti merkitsevää.

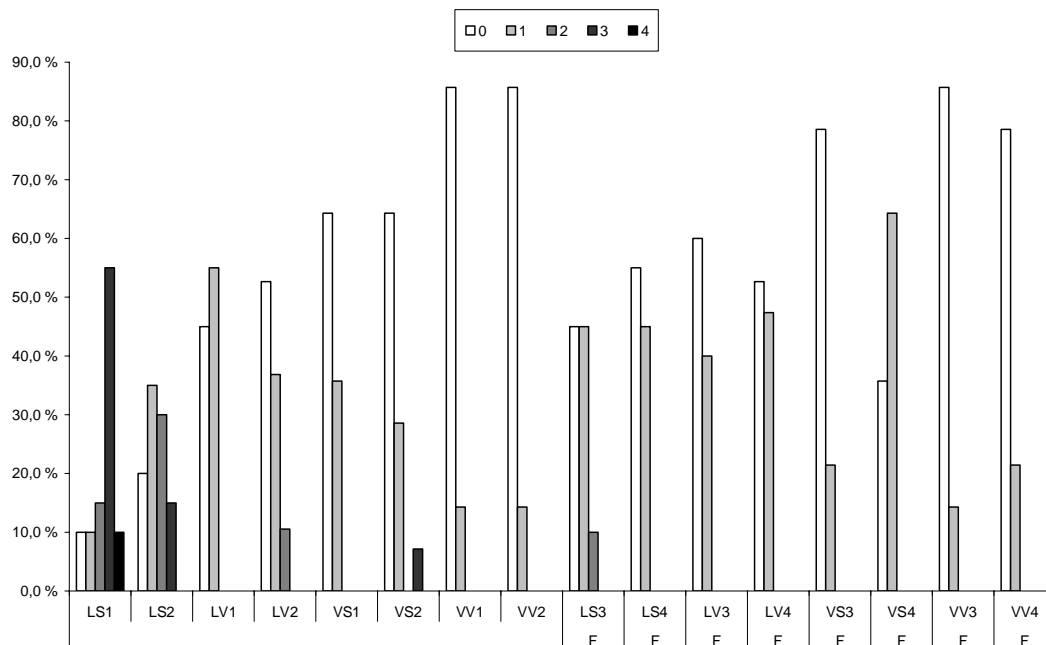
Elokuussa laitosemojen poikasilla oli selvästi korkeammat Ich-prevalenssit kolumnaaritautiin sairastumattomissa kuin taudin sairastaneissa standardialtaissa (Fisherin eksakti testi, $p = 0,002$). Vastaava ero havaittiin myös virikealtaissa, ja villiemojen poikasilla tilanne vaikuttaa olleen päinvastainen, mutta nämä erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä.

Taulukko 5. Ich-prevalenssit ja niiden tilastollinen merkitsevyys käsittelyittäin heinäkuussa (a) kolumnaaritautiin sairastumattomilla (n = 133) ja (b) kolumnaaritaudin sairastaneilla (n = 130) sekä elokuussa (c) kolumnaaritautiin sairastumattomilla (n = 135) ja (d) kolumnaaritaudin sairastaneilla (n = 135). Prosenttiluvun alla on sulkeissa prevalenssille laskettu 95 % luottamusväli.

(a)	Standardi	Virike	Fisherin eksakti p-arvo
Laitos	42,5 % (28,5 – 57,8)	55,0 % (39,8 – 69,3)	0,371
Villi	22,2 % (10,6 – 40,7)	57,7 % (39,0 – 74,5)	0,012
Fisherin eksakti p-arvo	0,117	1,000	
(b)	Standardi	Virike	Fisherin eksakti p-arvo
Laitos	52,5 % (37,5 – 67,1)	25,6 % (14,5 – 41,0)	0,021
Villi	26,9 % (13,7 – 46,1)	24,0 % (11,5 – 43,4)	1,000
Fisherin eksakti p-arvo	0,046	1,000	
(c)	Standardi	Virike	Fisherin eksakti p-arvo
Laitos	85,0 % (70,9 – 92,9)	51,3 % (36,2 – 66,2)	0,002
Villi	35,7 % (20,7 – 54,3)	14,3 % (5,7 – 31,5)	0,121
Fisherin eksakti p-arvo	< 0,001	0,002	
(d)	Standardi	Virike	Fisherin eksakti p-arvo
Laitos	50,0 % (35,2 – 64,8)	43,6 % (29,3 – 59,0)	0,654
Villi	42,9 % (26,5 – 61,0)	17,9 % (7,9 – 35,6)	0,080
Fisherin eksakti p-arvo	0,626	0,036	



a)



b)

Kuva 10. Ich-infestaation voimakkuus ulkoaltaissa heinäkuussa (a) ja elokuussa (b). Pylvään tummuus kuvaa loisluokkaa (0 – 4): mitä tummempi väri, sitä enemmän loisia. Pystyakselilla on tietystä loisluokassa olleiden näytekalojen %-osuus kyseisestä altaasta tutkittujen kalojen määrästä (a. n = 12 – 20; b. n = 14 – 20) ja vaaka-akselilla on tutkitut altaat käsittelyittain (LS = ”laitos-standardi”, LV = ”laitos-virike”, VS = ”villi-standardi” ja VV = ”villi-virike”). Vaaka-akselin ”F” kirjain tarkoittaa, että kyseisessä altaassa oli heinäkuussa *Flavobacterium columnare* -tartunta. Pylväiden summa samassa altaassa samassa kuussa on 100 %.

5 POHDINTA

Tutkimuksessa havaittiin seuraavat sekä Fisherin eksaktin testin että 95 %:n luottamusvälin mukaan tilastollisesti merkitsevät yhteydet loisprevalenssin ja emotaustan tai kasvatuksen välillä:

1. Laitosemojen poikasilla *Trichodina*-prevalenssi oli vähäisempi standardialtaissa kuin virikealtaissa ($p = 0,002$) ulkokasvatuksen aikana heinäkuussa.
2. Standardialtaissa *Trichodina*-prevalenssi oli vähäisempi laitosemojen poikasilla kuin villiemojen poikasilla ($p < 0,001$) ulkoaltailla heinäkuussa.
3. Ich-prevalenssi oli suurempi laitosemojen poikasilla kuin villiemojen poikasilla sekä standardi- ($p = 0,002$) että virikekasvatuksessa ($p < 0,001$) ulkoaltailla elokuussa.
4. Altaissa, joissa ei ollut ollut kolumnaaritautia, oli laitosemojen poikasilla huomattavasti suurempi Ich-prevalenssi kuin villiemojen poikasilla molemmissa kasvatustavoissa (standardi $p < 0,001$; virike $p = 0,002$) ulkoaltaissa elokuussa.
5. Altaissa, joissa ei ollut ollut kolumnaaritautia, oli laitosemojen poikasilla suurempi Ich-prevalenssi standardialtaissa kuin virikealtaissa ($p = 0,002$) ulkokasvatuskaudella elokuussa.
6. Laitosemojen poikasilla oli selvästi korkeammat Ich-prevalenssit kolumnaaritautiin sairastumattomissa kuin taudin sairastaneissa standardialtaissa ($p = 0,002$) ulkoaltailla elokuussa.

Muilta osin tutkimuksessa todettiin vahvoja trendejä kuolleisuuden, Ich-infestaation, emotaustan ja kasvatuksen välisistä yhteyksistä (luottamusvälit menivät hieman päällekkäin, vaikka Fisherin eksaktin testin p -arvo oli tilastollisesti merkitsevä). Tulosten perusteella voidaan siis alustavasti sanoa, että loisinfestaation ja emo- sekä kasvatustaustan välillä on yhteyksiä, jotka kannattaisi vahvistaa jatkotutkimusten avulla. Mahdolliset sekoittavat tekijät, kuten altaiden väliset erot, muut tarttuvat taudit ja kalayksilön loisinfestaation riippuvuus ajallisista ja paikallisista olosuhteista sekä fysiologisesta tilasta, tulisi ottaa vielä paremmin huomioon tutkimusasetelmassa ja tutkittavien altaiden määrässä. Tarpeeksi isolla altaiden määrällä voidaan sekoittavia tekijöitä (esimerkiksi ulkolämpötila) kontrolloida monimuuttujamalleissa.

5.1 Tulosten luotettavuus ja aineiston riittävyys

Tutkimusasetelmaa täytyi kokeen jo alettua muuttaa, sillä alun perin oli tarkoitus merkitä mikrosiruin jokaisesta altaasta 20 kalaa ja seurata samojen kalojen loisinfestaation kehittymistä kesän 2010 ajan toteutettavin näytteenotoin. Kalojen mikrosirutuksesta kertovat, selkävän tyveen kiinnitetyt ulkoiset merkinnät eivät kuitenkaan pysyneet poikashallin lohissa, minkä vuoksi sirutettuja kaloja ei pystyttykään ulkoisten merkkien avulla tunnistamaan lajitoveriensä seasta. Alkuperäisestä ajatuksesta oli luovuttava koska arvioitiin, että mikrosirun ID- koodin tarkistaminen kaikista altaan kaloista olisi ollut kaloille liian stressaavaa. Tämän vuoksi tutkimusasetelma kehittyi lopulliseen muotoonsa vasta kesän aikana.

Sisäkasvatuksen aikana otettiin näytteitä vain laitosemojen poikasten altaista, joten tietoa siitä, millainen loisinfestaatio oli villiemojen poikasten altaissa ennen ulkoaltaisiin siirtämistä, ei ole olemassa. Oletettavasti sisäaltaissa esiintyneissä loislajeissa ei ollut eroja eri käsittelyjen välillä, sillä kaikkien altaiden vesitys tuli samasta järvestä. Aineiston perusteella ei pystytä kuitenkaan arvioimaan onko loisprevalenssissa ja loisinnan intensiteetissä ollut eroja eri emotaustojen välillä jo sisäaltaissa.

Tutkimus löysi useita tilastollisesti merkitseviä eroja eri käsittelytasojen loisprevalenssien välillä. Hajonta oli kuitenkin suurta, mitä kuvaavat suhteellisen leveät luottamusvälit. Yksittäisten altaiden väliset prevalenssierot olivat suuria, mikä on tyyppistä kaloilla tehtäville kokeellisille tutkimuksille (Koski, henkilökohtainen tiedonanto). Tämä asettaa haasteita tulosten tarkasteluun käsittelyjen tasolla: allaskohtaisen vaihtelun vaikutukset tulisi huomioida suurentamalla otoskokoa, mutta lisensiaatin tutkielman puitteissa näin suuret näytemäärät eivät olleet mahdollisia. Jos oletetaan, että yhden altaan loisprevalenssi olisi 50 %, allaskohtaisen loisprevalenssin määrittämiseksi tulisi – 95 %:n luottamustasolla ja ± 5 prosenttiyksikön tarkkuudella – yhdestä altaasta ottaa 325 kalaa 2000 kalan joukosta (Sergeant 2014a). Jos halutaan verrata kahden eri käsittelyn prevalensseja, niin 95 %:n luottamustasolla ja sallimalla tyypin II -virheeksi 20 % molemmista käsittelyistä tulisi ottaa haastavimmassa tilanteessa 538 kalaa. Tällöin prevalenssien oletettaisiin olevan esimerkiksi 40 % ja 50 % (Sergeant 2014b).

Loiskartoituksen aikana näytteenottomenetelmässä tapahtui pieniä muutoksia, näytteitä tutkimassa oli useita henkilöitä ja sokkoutusta ei ollut, mitkä ovat voineet vaikuttaa tutkimustuloksiin joko lisäämällä tai vähentämällä tilastollisia eroja. Ihoalue, jolta limanäyte otettiin, oli erikokoinen sisä- ja ulkoaltaiden näytteenotossa kalojen kasvaneesta koosta johtuen. Lisäksi ulkoaltailta kaloja kuljetettiin useita minuutteja nu-

kutusaineliuoksessa ennen näytteenottoa. Näiden tekijöiden – sekä nukutusaineen vaihtumisen – ansiosta näytteisiin on voinut päätyä systemaattisesti enemmän tai vähemmän loisia kunkin näytteenottomenetelmässä tapahtuneen muutoksen jälkeen. Saman näytteenottokerran aikana menetelmät ovat kuitenkin olleet yhtenäisiä, mutta on mahdollista, että iholimanäytteenottotavassa on ollut tutkimuksen aikana pieniä eroja eri tutkijoiden välillä. Sokkoutuksen puuttuminen on tuskin vaikuttanut voimakkaasti näytteiden analysointiin, sillä näytteissä olleet loiset olivat helposti laskettavissa, loismäärien luokittelu oli selkeää ja näin ollen tulkinnanvaraa tuloksen paikkansapitävyydestä ei juuri päässyt syntymään.

Loisinfestaation voimakkuuden arvioinnissa käytetty tutkimusteknisistä syistä laadittu loisluokitus (asteikko 0 – 5) ei ota kantaa siihen, ovatko havaitut loismäärät ja infestaation voimakkuus kliinisesti merkittäviä. Näytteen tutkimisvaiheessa luokitus on kuitenkin mitä todennäköisimmin helpottanut yhtenäistämään tuloksia eri tutkijoiden välillä etenkin näytteiden loismäärien ollessa suuria. Tällä asteikolla havaittu voimakas Ich-infestaatio (luokka 3 ja 4) vaikuttaa olleen yhteydessä korkeaan kuolleisuuteen altaassa. Tämä tukee ajatusta, että luokituksella on pystytty arvioimaan todellista tautipainetta Ich-infestaation osalta. *Trichodina*-tartunnat taas ovat harvoin kliinisesti merkittäviä, eikä niitä yleensä hoideta kalanviljelylaitoksilla.

Edellä tilastollisesti merkitseviksi todettujen tulosten luotettavuutta tarkasteltaessa on huomioitava, että elokuun näytteenotossa laitos- ja villiemojen poikasten näytteiden tutkimisen välissä kului viikko, jonka aikana veden lämpötila ehti laskea muutamalla asteella. Altaiden loistilanne elää jatkuvasti ympäristöolosuhteiden – erityisesti lämpötilan – mukaan, joten viimeisen näytteenoton viivästys on mitä todennäköisimmin vaikuttanut esiintyneisiin loismääriin ja näin ollen saattaa virheellisesti korostaa villi- ja laitostaustaisten välistä eroa Ich-prevalensseissa. Koska villiemojen poikasten näytteet otettiin viileämmän veden aikaan, voi niissä sen vuoksi olla vähemmän loisia kuin laitosemojen poikasten näytteissä, jotka otettiin aikaisemmin veden lämpötilan ollessa vielä korkea.

Lisäksi ulkoaltailla heti siirron jälkeen vesityksessä tapahtui virhe, jossa kahdeksaan tutkimusaltaaseen johdettiin pelkkää lämmintä pintavettä. Tapahtuma on väistämättä vaikuttanut kyseisissä altaissa esiintyneisiin taudinaiheuttajiin ja niiden aiheuttamaan kuolleisuuteen. Vain pintavettä saaneissa altaissa esiintyi *Flavobacterium columnare* -tartunta, ja tutkimusasetelman neljä käsittelyä jakautuivat kahteen ryhmään sairastetun kolumnaaritaudin suhteen. Tulosten perusteella flavobakteeritartunnalla on

selvästi ollut vaikutusta altaiden loistautidynamiikkaan; tutkimusaltaita tulisikin mahdollisesti tarkastella neljän sijasta kahdeksan eri ”käsittelyn” suhteen.

Päivittäisestä kuolleisuudesta kerätty aineisto on yksiselitteinen ja koko seuranta-ajan kattava, joten sen perusteella on mahdollista tehdä päätelmiä niin allas-, tauti- kuin käsittelykohtaisesta kuolleisuudesta. Myös kuolleisuuden osalta altaiden välillä oli kuitenkin suurta hajontaa. Kuolleisuuskvaajista tehtyjen havaintojen arvioimiseksi tulisi kyseistä aineistoa tutkia vielä lisää tilastollisin menetelmin (esimerkiksi logistisella regressioanalyysillä), jos otokoko (altaiden määrä) vain sen sallii. Se ei kuitenkaan enää mahdu tämän liseniaatin tutkielman työmäärään.

5.2 Tulosten tulkinta ja merkitys

Tutkimuksessa käytetty virikekasvatusmenetelmä kehitettiin alun perin istukaspoikasten luonnossa menestymisen parantamiseksi, ja ensin oletettiin virikkeellisyyden ja luonnonemotaustan voivan vaikuttaa negatiivisesti kasvatusaikaiseen menestykseen. Villiemojen poikasten arveltiin selviytyvän laitosoloissa huonommin mutta luonnossa paremmin kuin laitosemojen poikasten, koska luontoon sopeuttavat ominaisuudet saattaisivat olla epäedullisia laitosolosuhteissa. Lisäksi virikerakenteiden ajateltiin olevan hankalasti puhtaanapidettäviä, jolloin kasvatusaikaisia tartuntatauteja ja kuolleisuutta saattaisi esiintyä enemmän virike- kuin standardialtaissa hygienian heikkenemisen myötä. Tämän liseniaatin tutkielman aloitusvaiheessa virikeallas-tutkimusprojektin alustavat tulokset kuitenkin viittasivat asian olevan toisin: virike- ja luonnonemotaustalla oli havaittu olevan myönteistä vaikutusta myös kasvatusaikaiseen menestykseen. Tutkimushypoteesi muotoutui tämän havainnon pohjalta ja tutkielman yhtenä tavoitteena oli selvittää tarkemmin lähdekirjallisuuden avulla, mistä havaitut vaikutukset voisivat johtua.

Kokeellisessa osiossa havaittu taudinaiheuttajien esiintyminen noudatti aikaisemmissa suomalaistutkimuksissa kuvattua riippuvaisuutta lämpötilasta ja/tai kalojen iästä (Rintamäki-Kinnunen & Valtonen 1997, Pulkkinen ym. 2010). Seuranta-aikana käytetyt torjuntakeinot olivat tehokkaita esiintyneitä tauteja vastaan: lämpimän veden kiihdyttämä flavobakteerikuolleisuus päättyi oksitetrasyklinikuuriin ja ajoissa aloitettuihin, toistuvien formaliinikylvetyksien saatiin pääosin pidettyä Ich-kuolleisuus kurissa kaikissa altaissa. Useissa muissakin tutkimuksissa on todettu näiden hoitojen olevan tehokkaita (Picón-Camacho ym. 2012, Declercq ym. 2013). Formaliinikylvetysten vuoksi viimeisessä näytteenotossa ei esiintynyt ollenkaan *Trichodina*-loista, mutta Ich-

loismuodot selviytyivät kemikaalilta suojassa kalan ihon alla pitäen jatkuvasti yllä lievää infestaatiota.

Koeasetelmasta johtuen tässä tutkimuksessa Ich:n torjuntaan käytettiin formaliinikylvetysten rinnalla virikealtaissa myös nopeaa veden vaihtuvuutta ja virtausnopeutta. Aikaisemmin nopean virtauksen tehosta Ich:n torjunnassa ovat raportoineet Bodensteiner ym. (2000), joiden mukaan altaan veden vaihtuessa vähintään 2,1 kertaa tunnissa Ich-tartunnat saatiin pilkkupiikkimonneilla torjuttua. Tämän lisensiaatin tutkielman kokeellisessa osassa oli havaittavissa hypoteesin mukainen vahva trendi Ich-prevalenssin ja kasvatustaustan välisessä yhteydessä: loista esiintyi pääosin enemmän standardi- kuin virikealtaissa. Lisäksi Ich:n aiheuttama kuolleisuus oli korkeinta standardialtaissa. Veden vaihtuvuus ulkokasvatuskaudella oli virikealtaissa 1,9 kertaa tunnissa, kun se standardialtaissa oli vain 0,46 kertaa tunnissa. Nopea virtaus on voinut vaikeuttaa parveilijoiden pääsyä potentiaaliseen isäntäkalaan tai vähentää virikealtaiden tartuntapainetta huuhtomalla vapaana uivia ja pohjalle koteloituneita loisia pois altaasta, kuten Bodensteiner ym. (2000) ehdottivat.

Veden nopean vaihtuvuuden ja virtauksen on osoitettu aiemmin vähentäneen myös *Trichodina*-tartuntoja ja kuolleisuutta (Johansson & Svensson 1977). Nyt tehdyssä tutkimuksessa kuitenkin todettiin *Trichodina*-prevalenssin tilastollisesti merkitsevän yhteyden emo- ja kasvatustaustaan olleen Ich:llä havaitusta yhteydestä poikkeava: voimakkaan virtauksen virikealtaissa esiintyi ulkoaltaissa enemmän *Trichodina*-loista kuin hitaamman virtauksen standardialtaissa. Sisäkasvatuskaudella asia oli päinvastoin. *Trichodina*-prevalenssi oli ulkoaltaissa suurempi villiemojen poikasissa kuin laitostaustaisissa, kun Ich:iä taas esiintyi pääasiassa enemmän nimenomaan laitos- ja standardikaloissa. Havaintojen pohjalta herää kysymys, tarjosivatko villi- ja viriketausta paremman immunitetin patogeenista Ich:iä vastaan, tai olisiko voimakas *Trichodina*-infestatio aktivoinut immuunipuolustusta ja näin voimistanut kalan vastustuskykyä Ich:lle.

Khan ym. (1991) esittivät voimakkaan *Trichodina*-tartunnan altistaneen kaloja sekundaarisille bakteeri-infektioille ja sitä kautta kuolleisuudelle. Tässä tutkimuksessa suurtenkaan *Trichodina*-infestaatioiden ei todettu aiheuttaneen kuolleisuutta. Tehtyjen havaintojen perusteella sairastettu flavobakteeri-infektio näyttäisi itse asiassa olleen niin *Trichodina*- kuin Ich-loisinnalta ja myöhemmältä valkopilkkukuolleisuudelta suojaava tekijä. Altailta ei tosin kerätty kolumnaaritaudin aikaista loisprevalenssidataa,

joten taudinaiheuttajien yhtäaikaista esiintymistä ja vaikutuksia toisiinsa ei voida arvioida.

Kolumnaaritaudin aiheuttamien vaikutusten pohtiminen on mielenkiintoinen kysymys, johon tällä tutkimusasetelmalla ei voida saada selkeitä vastauksia. Kuitenkin loisprevalensseissa havaittiin eroja flavobakteeritartuntaan sairastuneen ja sairastumattoman ryhmän välillä. Kolumnaaritauti mahdollisesti tappoi sairastuneista altaista suurimman osan immuunipuolustukseltaan heikoista yksilöistä, jolloin altaisiin jäi kaloja, joiden vastustuskyky oli luonnostaan voimakkaampi ja näin niiden loisinfestaatio ja kuolleisuus vähäisempää. Toisaalta sairastettu bakteeritartunta on voinut toimia ”epäspesifisenä” immuunipuolustuksen aktivaattorina, minkä on aiemmin osoitettu ehkäisevän Ich-infestaatiota (Buchmann ym. 2001).

Ulkoaltaissa kokonaiskuolleisuus oli korkeampaa villi- kuin laitosemojen poikasilla, kun taas sisäaltaissa kuolleisuusluvut olivat silmämääräisesti suurempia laitost- ja standardi- kuin villi- ja virikekaloilla. Sisäaltaiden kuolleisuus on siis ollut hypoteesin mukainen. Kuolleisuus kolumnaaritautiin oli vähäisintä laitospoikasilla standardialtaissa ja korkeinta villipoikasilla virikealtaissa, mikä ei puhu villitaustan ja virikeellisuuden aiheuttaman paremman vastustuskyvyn puolesta. Teoriassa on mahdollista, että laitoslohikanta olisi sopeutunut villikantaa paremmin vastustamaan pitkään laitosolosuhteissa virulentiksi kehittyntä patogeenia (Pulkkinen ym. 2010), mutta tässä tapauksessa laitoskanta on ollut peräisin kasvatusympäristöstä, jossa *Flavobacterium columnare* -bakteeria ei ole tavattu.

Heinäkuussa altaissa, joissa ei sairastettu kolumnaaritautia, Ich-prevalenssi oli muista tuloksista poiketen villiemojen poikasilla hitaan virtauksen standardialtaissa alhaisempi kuin virikealtaissa. Myös laitosemojen poikasissa havaittiin tuolloin vastaava ero, mutta tulos ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Elokuussa tilanne oli päinvastainen ja havaitut yhteydet tilastollisesti merkitseviä. Heinäkuun poikkeaman syy villipoikasissa jää epäselväksi. Ehkäpä Ich-tartunnan alkaessa altaissa, joissa ei ollut muita taudinaiheuttajia, valkopilkkutauti on noudattanut samaa dynamiikkaa kuin toisissa altaissa riehunut kolumnaaritauti, joka oli kohtalokas erityisesti villipoikasille virikealtaissa. Jokin tekijä villi-viriketaustassa olisi siis altistanut tartunnalle kalan ollessa ensikosketuksessa patogeeniin. Erojen taustalla vaikuttaa todennäköisesti kaloja ympäristöoloihinsa sopeuttavia monimutkaisia mekanismeja. Tutkimuksessa käytettiin koejärjestelyä, jossa kasvatusympäristössä muunneltiin samanaikaisesti useaa osatekijää. Tällainen asetelma

vaatisi todennäköisesti useampia altaita ja tarkasteltavia käsittelyjä kuin nyt käytettiin, jotta eri komponenttien vaikutukset voitaisiin saada selville.

Viitteet Ich- ja *Trichodina* -loisten sekä *F. columnare* -bakteerin erilaisesta esiintyvyydestä olosuhteisiin ja emotaustaan nähden korostavat patogeeni-isäntä - vuorovaikutusmekanismien ymmärtämisen merkitystä ympäristötekijöiden vaikutusta tutkittaessa. Pohdittavaksi jää myös monta kysymystä virikkeellisen kasvatusympäristön vaikutuksista kalan stressiin ja vastustuskykyyn. Missä kulkee fysiologisten ja patologisten vaikutusten raja: aiheutuuko sairastuminen ja kuolleisuus liiasta vai liian vähäisestä immunostimulaatiosta – liiasta vai liian vähäisestä stressistä? Onko piilopaikkojen ansiosta sosiaalinen vuorovaikutus vähemmän stressaavaa virike- kuin standardialtaissa ja mahdollistuuko lohien luonnollinen reviirikäyttäytyminen paremmin virikealtaissa? Onko kala vaihtelevassa ympäristössä, jossa vaaditaan jatkuvaa sopeutumista uusiin olosuhteisiin, vähemmän vai enemmän stressaantunut kuin staattisessa ympäristössä? Kerääntykö virikerakenteisiin likaa ja epäpuhtauksia, jotka aiheuttavat vastustuskyvyn heikkenemistä tai toisaalta epäspesifistä immunostimulaatiota, vai onko virikealtaissa orgaanista materiaalia nopean veden virtauksen vuoksi vähän, kun loiset ja epäterveelliset metaboliatuotteet huuhtoutuvat pois altaasta? Tulisi myös selvittää, onko vakavimmin sairastuvilla kaloilla liian heikko vai liian voimakkaisiin oireisiin johtava immuunivaste, ja mitkä tekijät kalan ympäristössä tai perimässä edesauttavat tehokkaan vastustuskyvyn kehittymistä.

5.3 Johtopäätökset ja jatkotutkimuksen tarpeet

Tässä tutkimuksessa käytetyllä kasvatusmenetelmällä on jo pystytty parantamaan istuk- kaiden menestystä luonnossa (Hyvärinen & Rodewald 2013). Jos osoittautuu, kuten alustavat tulokset viittaavat, että virikkeellistäminen vähentää merkittävien loispato- geenien esiintymistä kasvatusaikana, voisi sitä soveltaa myös muissa makean veden kalan- kasvatuksen muodoissa. Virikkeellistämisen myötä kasvavat työ- ja rakennekustannuk- set saattaisivat maksaa itsensä takaisin madaltuneina lääkintäkustannuksina ja alentu- neina tuotantotappioina. Lisäksi vähäisempi sairastavuus ja kuolleisuus lisäisivät kalo- jen hyvinvointia, johon voivat vaikuttaa myönteisesti myös muut virikekasvatuksen mukanaan tuomat olosuhdemuutokset.

Ich:n torjuntaan on malakiittivihreän kieltämisen jälkeen pyritty löytä- mään tehokasta, kestävä ja ympäristöystävällistä ratkaisua siinä vielä onnistumatta (Bodensteiner ym. 2000, Rintamäki-Kinnunen ym. 2005, Picón-Camacho ym. 2012).

Tässä tutkimuksessa saatiin viitteitä siitä, että virikkeellisyys ja villiemotausta vähentävät alttiutta Ich-infestaatiolle ja kuolleisuudelle. Tutkimus tukee näin Bodensteinerin ym. (2000) havaintoja, joiden mukaan nopea veden virtaus ja vaihtuvuus saattavat olla avainasemassa uutta Ich-torjuntamenetelmää kehitettäessä. Kasvatusympäristön ja emotaustan vaikutukset *Trichodina* -loisen ja *F. columnare* -bakteerin esiintymiseen vaikuttivat kuitenkin olevan päinvastaisia kuin Ich:iin, joten aihetta tulee tutkia lisää ympäristötekijä- ja taudinaiheuttajakohaisten vaikutusten selvittämiseksi ja tarkemman hyötyhaitta-arvion saamiseksi.

Lois- ja bakteeritautien mekanismeja on tutkittu runsaasti (Ewing & Kocan 1987, Buchmann ym. 2001, Wang ym. 2002, Suomalainen ym. 2005, Kunttu 2010, Pulkkinen ym. 2010, von Gersdorff Jorgensen ym. 2012, Declercq ym. 2013, Dickerson & Findly 2014), mutta edelleen tarvitaan tietoa patogeeni-isäntä -vuorovaikutuksista sekä taudinaiheutuskyvyn ja vastustuskyvyn muodostumisesta organismin fysiologian ja ympäristöolosuhteiden summana. Kun tunnetaan mm. patogeenin taudinaiheutusmekanismi ja isännän immuunipuolustuksen reagointi tiettyyn taudinaiheuttajaan, voidaan selvittää, millaista vaihtelua niissä esiintyy tartunnan saavien ja terveiden, lievän ja voimakkaan tartunnan saavien, sekä tartunnasta selviävien ja siihen kuolevien yksilöiden välillä. Kun virulenssi-, patogeneesi- ja immunologiset mekanismit tunnetaan, voidaan tietoa yhdistää tutkimukseen olosuhdetekijöiden vaikutuksista taudinaiheuttajan ja kalan ominaisuuksiin sekä patogeeni-isäntä -vuorovaikutukseen.

Jotta kasvatusolosuhteita säätämällä saataisiin toivottuja vaikutuksia, on tunnettava, miksi ja millä mekanismeilla tietyt ympäristötekijät muuttavat tautidynamiikkaa eli ehkäisevät tai lisäävät tartuntatautien esiintymistä. Tätä on mahdollista tutkia vain purkamalla ympäristö yksittäisiin muuttujiin, mikä asettaa käytännön haasteita tutkimusasetelmalle ja koejärjestelyille. Eri tekijöiden vaikutusten selvittämiseksi virikeallaskasvatuksen elementit olisi pilkottava osiin ja tarkasteltava yhtä olosuhdetekijää (veden virtaus, suojapaikat, ravinto ym.) kerrallaan. Toisaalta kasvatusympäristö ei ole vain tekijöidensä summa: olosuhteet ovat riippuvaisia toisistaan, joten vuorovaikutukset ja sekoittavat tekijät tulisi pyrkiä huomioimaan tilastollisessa käsittelyssä monimuuttujamalleissa.

Tämän tutkimuksen perusteella vaikuttaa, että kasvatusympäristöllä ja emotaustalla on vahva yhteys tarttuvien tautien esiintymiseen ja kuolleisuuteen kasvatusaikana. Jatkotutkimusta tarvitaan kuitenkin sen selvittämiseksi, aiheuttavako vaihtelevuus ja luonnonmukaisuus positiivisia vai negatiivisia vaikutuksia kasvatusaikana ja

mitkä tekijät ovat vaikutusten taustalla. Tutkimusta tulee suunnata virulenssin ja patogeenesisen sekä immuunivasteen mekanismien selvittämiseen, eri loisten täsmälliseen lajintunnistukseen ja niiden tyyppikohtaisiin eroihin taudinaiheutuksessa, kalojen stressitasoihin ja stressin aiheuttajiin virike- ja standardikasvatuksessa sekä veden virtaukseen tautien torjuntamenetelmänä (ts. mitkä ovat kovan virtauksen vaikutukset esimerkiksi altaan loismäärään, kolonisaation mahdollisuuksiin ja kalan kuntoon). Mielenkiintoista olisi myös tarkastella, vaikuttaako vaihteleva ympäristö kasvatusaikaiseen kuolleisuuteen muutoin kuin tarttuvien tautien osalta – hyvinvoinnin lisääntymisen tai vähenemisen kautta.

6 LÄHDELUETTELO

- Anttila K, Mänttari S, Järvilehto M. Effects of different training protocols on Ca²⁺ handling and oxidative capacity in skeletal muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). J Exp Biol 2006, 209: 2971-2978.
- Araki H, Cooper B, Blouin MS. Genetic Effects of Captive Breeding Cause a Rapid, Cumulative Fitness Decline in the Wild. Science 2007, 318: 100-103.
- Basson L & Van As J. Trichodinidae and Other Ciliophorans (Phylum Ciliophora). Teoksessa: Woo PTK (toim.) Fish Diseases and Disorders Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections. 2. p. CABI Publishing, King's Lynn 2006: 154-182.
- Berejikian BA, Tezak EP, Riley SC, LaRae AL. Competitive ability and social behaviour of juvenile steelhead reared in enriched and conventional hatchery tanks and a stream environment. J Fish Biol 2001, 59: 1600-1613.
- Bodensteiner LR, Sheehan RJ, Wills PS, Brandenburg AM, Lewis WM. Flowing Water: An Effective Treatment for Ichthyophthiriasis. J Aquat Anim Health 2000, 12: 209.
- Braithwaite VA, Salvanes AG. Environmental variability in the early rearing environment generates behaviourally flexible cod: implications for rehabilitating wild populations. Proc Biol Sci 2005, 272: 1107-1113.
- Brockmark S, Neregård L, Bohlin T, Björnsson BT, Johnsson JI. Effects of Rearing Density and Structural Complexity on the Pre- and Postrelease Performance of Atlantic Salmon. Trans Am Fish Soc 2007, 136: 1453-1462.
- Brockmark S. Environmental influences on the behavioural ecology of juvenile salmonids - the importance of rearing density. Väitöskirja. 1. p. Göteborgs Universitet, Göteborg 2009.
- Brockmark S, Johnsson JI. Reduced hatchery rearing density increases social dominance, postrelease growth, and survival in brown trout (*Salmo trutta*). Can J Fish Aquat Sci 2010, 67: 288-295.
- Brown C, Day RL. The future of stock enhancements: lessons for hatchery practice from conservation biology. Fish fish 2002, 3: 79-94.
- Brown C, Davidson T, Laland K. Environmental enrichment and prior experience of live prey improve foraging behaviour in hatchery-reared Atlantic salmon. J Fish Biol 2003, 63: 187-196.
- Buchmann K, Sigh J, Nielsen CV, Dalgaard M. Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. Vet Parasitol 2001, 100: 105-116.
- Casella G & Berger RL. Statistical Inference. Teoksessa: Casella G & Berger RL (toim.) Statistical Inference. 1. p. Wadsworth & Brooks/Cole, Pacific Grove, CA 1990: 444-445.

- Coyne RS, Hannick L, Shanmugam D, Hostetler JB, Bami D, Joardar VS, Johnson J, Radune D, Singh I, Badger JH, Kumar U, Saier M, Wang Y, Cai H, Gu J, Mather MW, Vaidya AB, Wilkes DE, Rajagopalan V, Asai DJ, Pearson CG, Findly RC, Dickerson HW, Wu M, Martens C, Van de Peer Y, Roos DS, Cassidy-Hanley DM, Clark TG. Comparative genomics of the pathogenic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*, its free-living relatives and a host species provide insights into adoption of a parasitic lifestyle and prospects for disease control. *Genome Biol.* 2011, 12: R100-2011-12-10-r100.
- Declercq AM, Haesebrouck F, Van den Broeck W, Bossier P, Decostere A. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. *Vet Res* 2013, 44: 27-9716-44-27.
- Dickerson HW. *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). Teoksessa: Woo PTK (toim.) Fish Diseases and Disorders Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections. 2. p. CABI Publishing, King's Lynn 2006: 116-153.
- Dickerson HW, Findly RC. Immunity to *Ichthyophthirius* infections in fish: A synopsis. *Dev Comp Immunol* 2014, 43: 290-299.
- Ewing MS, Kocan KM. *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) exit from gill epithelium. *J Protozool* 1987, 34: 309-312.
- Frankham R. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Mol Ecol* 2008, 17: 325-333.
- Gross MR. One species with two biologies: Atlantic salmon (*Salmo salar*) in the wild and in aquaculture. *Can J Fish Aquat Sci* 1998, 55 (Suppl. 1): 131-144.
- Huntingford FA. Implications of domestication and rearing conditions for the behaviour of cultivated fishes. *J Fish Biol* 2004, 65: 122-142.
- Hyvärinen P, Rodewald P. Enriched rearing improves survival of hatchery reared Atlantic salmon smolts during migration in the River Tornionjoki. *Can J Fish Aquat Sci* 2013, 70: 1386-1395.
- Isaksen T, Karlsbakk E, Sundnes G, Nylund A. Patterns of *Ichthyobodo necator* sensu stricto infections on hatchery-reared Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway. *Dis Aquat Organ* 2010, 88: 207-214.
- Johansson N, Svensson KM. Effect of water velocity on mortalities attributed to trichodiniasis in hatchery - reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Laxforskninginstitutet Meddelande* 1977, 2: 1-5.
- Kallio-Nyberg I, Jutila E, Saloniemi I, Jokikokko E. Associations between environmental factors, smolt size and the survival of wild and reared Atlantic salmon from the Simojoki River in the Baltic Sea. *J Fish Biol* 2004, 65: 122-134.
- Keenleyside M, Yamamoto F. Territorial Behaviour of Juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Behaviour* 1962, 19: 139-169.

Khan R. Mortality in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Associated with Trichodinid Ciliates. J Wildlife Dis 1991, 27(1): 153-155.

Koli L. Lohikalat *Salmoniformes*. Teoksessa: Koli L (toim.) Suomen eläimet 3. 1. p. Weilin+Göös, Espoo 1984: 102-103.

Koski P, Hirvelä-Koski V, Bernardet J. *Flexibacter columnaris* infection in Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.): first isolation in Finland. Bull Eur Ass Fish Pathol 1993, 13: 66-69.

Kunttu H. Characterizing the bacterial fish pathogen *Flavobacterium columnare*, and some factors affecting its pathogenicity. Väitöskirja. 1. p. University of Jyväskylä, Jyväskylä 2010.

Kunttu HM, Sundberg LR, Pulkkinen K, Valtonen ET. Environment may be the source of *Flavobacterium columnare* outbreaks at fish farms. Environ Microbiol Rep 2012, 4: 398-402.

Marttila M, Orell P, Erkinaro J, Romakkaniemi A, Huusko A, Jokikokko E, Vehanen T, Piironen J, Huhmarniemi A, Sutela T, Saura A, Mäki-Petäys A. Rakennettujen jokien kalataloudelle aiheutuneet vahingot ja kalatalousvelvoitteet, RKTL:n työraportteja 6/2014. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos, Helsinki 2014.

Maynard DJ, Flagg TA, Mahnken CWV, Schroder SL. Natural Rearing Technologies for Increasing Postrelease Survival of Hatchery-reared Salmon. Bull Natl Res Inst Aquacult Suppl 1996, 2: 71-77.

McDonald DG, Milligan CL, McFarlane WJ, Croke S, Currie S, Hooke B, Angus RB, Tufts BL, Davidson K. Condition and performance of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*): effects of rearing practices on hatchery fish and comparison with wild fish. Can J Fish Aquat Sci 1998, 55: 1208-1219.

Pickering AD, Pottinger TG. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. Fish physiol biochem 1989, 7: 253-258.

Picón-Camacho S, Marcos-Lopez M, Bron J, Shinn A. An Assessment of the Use of Drug and Non-drug Interventions in the Treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876, a Protozoan Parasite of Freshwater Fish. Parasitology 2012, 139: 149-190.

Pulkkinen K, Suomalainen LR, Read AF, Ebert D, Rintamäki P, Valtonen ET. Intensive fish farming and the evolution of pathogen virulence: the case of *columnaris* disease in Finland. Proc Biol Sci 2010, 277: 593-600.

Rahkonen R, Vennerström P, Rintamäki P, Kannel R. Terve kala. 2. p. Riistan ja kalan tutkimus, Helsinki 2012.

Rassi P, Hyvärinen E, Juslén A, Mannerkoski I. Suomen lajien uhanalaisuus – Punainen kirja 2010. Ympäristöministeriö ja Suomen ympäristökeskus, http://www.ym.fi/fi-FI/Ajankohtaista/Julkaisut/Erillisjulkaisut/Suomen_lajien_uhanalaisuus_Punainen_kirja%284709%29, haettu 2.3.2014, päivitetty 5.6.2013.

Reddy PK & Leatherland JF. Stress Physiology. Teoksessa: Leatherland JF & Woo PTK (toim.) Fish Diseases and Disorders Volume 2: Non-infectious Disorders. 1. p. CAB International, Guildford 1998: 279-301.

Rintamäki P, Torpström H, Bloigu A. *Chilodonella* spp. at Four Fish Farms in Northern Finland. J Eukaryot Microbiol 1994, 41: 602-607.

Rintamäki-Kinnunen P, Valtonen ET. Epizootiology of protozoans in farmed salmonids at northern latitudes. Int J Parasitol 1997, 27: 89-99.

Rintamäki-Kinnunen P, Rahkonen M, Mannermaa-Keränen AL, Suomalainen LR, Mykra H, Valtonen ET. Treatment of ichthyophthiriasis after malachite green. I. Concrete tanks at salmonid farms. Dis Aquat Organ 2005, 64: 69-76.

Robertson D. Host-parasite interactions between *Ichtyobodo necator* (Henneguy, 1883) and farmed salmonids. J Fish Dis 1979, 2: 481-491.

Rodewald P, Hyvärinen P, Hirvonen H. Wild origin and enriched environment promote foraging rate and learning to forage on natural prey of captive reared Atlantic salmon parr. Ecol Freshw Fish 2011, 20: 569-579.

Rodewald P. Effects of broodstock origin, rearing environment and release method on post-stocking performance of Atlantic salmon. Väitöskirja. 1. p. Unigrafia, Helsinki 2013.

Salminen M, Heinimaa P, Huusko A, Hyvärinen P, Kallio-Nyberg I, Kolari I, Lehtonen E, Leskelä A, Niva T, Piironen J, Romakkaniemi A, Vehanen T. Paremmat istukkaat, parempi istutustulos: Istutustutkimusohjelman 2006–2012 tuloksia. Riista- ja kalatalouden tutkimuslaitos, Helsinki 2013.

Salvanes AG, Braithwaite V. The need to understand the behaviour of fish reared for mariculture or restocking. ICES J Mar Sci 2006, 63: 346-354.

Salvanes AG, Moberg O, Ebbesson LO, Nilsen TO, Jensen KH, Braithwaite VA. Environmental enrichment promotes neural plasticity and cognitive ability in fish. Proc Biol Sci 2013, 280: 20131331.

Scholz T. Parasites in cultured and feral fish. Vet Parasitol 1999, 84: 317-335.

Sergeant E (Sergeant 2014a). Epitools epidemiological calculators (Sample size to estimate a proportion with specified precision). AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease, <http://epitools.ausvet.com.au>, haettu 31.3.2014.

Sergeant E (Sergeant 2014b). Epitools epidemiological calculators (Sample size to detect a significant difference between 2 proportions). AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease, <http://epitools.ausvet.com.au>, haettu 31.3.2014.

Speare D. Non-infectious Disorders Associated with Intensive Aquaculture Husbandry. Teoksessa: Leatherland J & Woo PTK (toim.) Fish Diseases and Disorders Volume 2: Non-infectious Disorders. 1. p. CAB International, Guildford 1998: 303-333.

Suomalainen LR, Tirola MA, Valtonen ET. Influence of rearing conditions on Flavobacterium columnare infection of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Dis 2005, 28: 271-277.

Tavolga W, Nigrelli R. Studies on *Costia necatrix* (Henneguy). T Am Microsc Soc 1947, 66: 366-378.

Teixeira CP, de Azevedo CS, Mendl M, Cipreste CF, Young RJ. Revisiting translocation and reintroduction programmes: the importance of considering stress. Anim Behav 2007, 73: 1-13.

Tieman DM, Goodwin AE. Treatments for Ich Infestations in Channel Catfish Evaluated under Static and Flow-Through Water Conditions. N Am J Aquacult 2001, 63: 293-299.

Tuunainen P. Lohi. Teoksessa: Koli L (toim.) Suomen eläimet 3. 1. p. Weilin+Göös, Espoo 1984: 121-130.

Valtonen ET, Keränen A. Ichthyophthiriasis of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., at the Montta Hatchery in northern Finland in 1978-1979. J Fish Dis 1981, 4: 405-411.

Valtonen ET, Koskivaara M. Relationships between the parasites of some wild and cultured fishes in two lakes and a fish farm in central Finland. Int J Parasitol 1994, 24: 109-118.

von Gersdorff Jorgensen L, Sigh J, Kania PW, Holten-Andersen L, Buchmann K, Clark T, Rasmussen JS, Einer-Jensen K, Lorenzen N. Approaches towards DNA vaccination against a skin ciliate parasite in fish. PLoS One 2012, 7: e48129-
doi:10.1371/journal.pone.0048129.

Wang X, Clark T, Noe J, Dickerson HW. Immunisation of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, with *Ichthyophthirius multifiliis* immobilisation antigens elicits serotype-specific protection. Fish Shellfish Immunol 2002, 13: 337-350.

Waples RS. Dispelling some myths about hatcheries. Fisheries 1999, 24(2): 12-21.

Wei JZ, Li H, Yu H. Ichthyophthiriasis: emphases on the epizootiology. Lett Appl Microbiol 2013, 57: 91-101.

Wohllebe S, Richter P, Hader DP. Chlorophyllin for the control of *Ichthyophthirius multifiliis* (Fouquet). Parasitol Res 2012, 111: 729-733.

Woo PTK. Diplomonadida (Phylum Parabasalia) and Kinetoplastea (Phylum Euglenozoa). Teoksessa: Woo PTK (toim.) Fish Diseases and Disorders Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections. 2. p. CABI Publishing, King's Lynn 2006: 46-112.

Wootten R, Smith. Studies on the parasite fauna of juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L., cultured in fresh water in eastern Scotland. Parasitol Res 1980, 63: 221-231.